

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-002895

(43)Date of publication of application : 08.01.2003

(51)Int.Cl. C07H 21/04

C12N 15/09

(21)Application number : 2001-162896 (71)Applicant : TOKYO INST OF TECHNOL

(22)Date of filing : 30.05.2001 (72)Inventor : SEKINE MITSUO
KIYOO KOJI
OKUBO AKIHIRO

(54) METHOD FOR SYNTHESIZING NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To synthesize a nucleic acid promptly and accurately.

SOLUTION: In this method for synthesizing the nucleic acid, the nucleic acid is synthesized without protecting a base part thereof, and nucleotides are subjected to a condensation reaction in the presence of a proton donor.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.09.2004

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application other
than the examiner's decision of rejection
or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

**JPO and NCIP are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The synthesis method of the nucleic acid characterized by being the approach of compounding the nucleic acid concerned, without protecting the base part of a nucleic acid, carrying out the condensation reaction of the nucleotides and carrying out phosphoric ester association under existence of a proton donor.

[Claim 2] The approach according to claim 1 that electric dissociation exponent of said proton donor is characterized by being 3.6 or less.

[Claim 3] An approach given in claim 1 or the 2nd term characterized by said proton donor being at least one sort chosen from 4-nitrobenzimidazole truffle RATO, 4-nitro-6-(trifluoromethyl) benzotriazol-1-yl, or the group that consists of triazole truffle RATO.

[Claim 4] An approach given in any 1 term of one to claim 3 term characterized by performing said condensation reaction by the liquid phase.

[Claim 5] An approach given in any 1 term of one to claim 3 term characterized by performing said condensation reaction by solid phase.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] Especially this invention relates to the synthesis method of the nucleic acid which compounds the nucleic acid concerned, without protecting the base part of a nucleic acid about the synthesis method of a nucleic acid.

[0002]

[Description of the Prior Art] The synthesis method of a nucleic acid is a technique which compounds a nucleic acid artificially, for example, in case it compounds a certain specific DNA primer artificially, it is a required technique. Moreover, if PCR is used, the target gene can also be amplified using an artificial DNA primer.

[0003] The main point of nucleic acid biosynthesis is activating the phosphoric-acid radical of the nucleotide which attached the protective group, and carrying out phosphoric ester association with the hydroxyl group of other nucleotides.

[0004] By current, the phosphorousaminodite method is well known as a synthesis method of a nucleic acid. A phosphorousaminodite method is a kind of a solid phase technique, and is the approach of simplifying isolation of synthetic intermediate field by combining a nucleotide with solid-states (base material), such as polystyrene, and carrying out chain expanding of it. The reagent which used this approach for the reaction, a superfluous nucleotide, etc. have the advantage removed only by washing a base material. Finally the specified substance which it is compounded and is attached to the base material is separated from a base material, and is refined by the chromatography etc.

[0005] Moreover, the base part non-protected aminodite method which can build a DNA oligomer is known for recently under the condition which does not use a

protective group for a nucleobase part.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, an above-mentioned phosphorousaminodite method is premised on using the protective group of an acyl mold for the amino group of the nucleobase section. For this reason, in order to obtain the last specified substance, it is necessary to carry out deprotection of this protective group, and generally ammoniation of long duration is performed for deprotection at 55 degrees C. However, if basic conditions like this ammoniation are used, when a target compound is unstable, the specified substance will decompose and the fall of synthetic yield and purity will be brought about.

[0007] Moreover, the glycosidic linkage of the nucleoside by which the base section was protected is unstable under an acid condition, and a depurination reaction tends to occur by the adenosine and the guanosine as compared with a non-protector.

[0008] Therefore, it is desirable to compound a nucleic acid without protecting the amino group of the base part of a nucleic acid.

[0009] However, in an above-mentioned non-protected aminodite method, the excessive process which carries out cleavage removal of the P-N association which it is known also to deoxycytidine (dC) and a deoxyadenosine (dA) base part that a condensation reaction will occur, therefore is produced for every cycle as a result of this side reaction is needed. In order to have removed P-N association, the process of making P-N association of the phosphachill-ized object to the amino group of a base part react with the bottom methanol of benzimidazole truffe RATO existence etc. was required. However, if such a process is needed, a desired nucleic acid cannot be compounded more quickly. Therefore, the approach of compounding a nucleic acid more quickly was desired.

[0010] Then, the purpose of this invention is to offer the approach of compounding a nucleic acid quickness and correctly.

[0011]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, artificers found out that a desired nucleic acid was correctly [quickly and] compoundable, as a result of compounding various condensing agents and repeating research wholeheartedly about a condensation reaction.

[0012] The synthesis method of the nucleic acid of this invention is the approach of compounding the nucleic acid concerned, without protecting the base part of a nucleic acid, and is characterized by carrying out the condensation reaction of the nucleotides under existence of a proton donor.

[0013] In the suitable embodiment of the synthesis method of the nucleic acid of this invention, electric dissociation exponent of said proton donor is characterized by being 3.6 or less.

[0014] In the suitable embodiment of the synthesis method of the nucleic acid of this invention, said proton donor is characterized by being at least one sort chosen from 4-nitrobenzimidazole trifluoromethane, 4-nitro-6-(trifluoromethyl) benzotriazole, or the group that consists of triazole trifluoromethane.

[0015] In the suitable embodiment of the synthesis method of the nucleic acid of this invention, it is characterized by performing said condensation reaction by the liquid phase.

[0016] In the suitable embodiment of the synthesis method of the nucleic acid of this invention, it is characterized by performing said condensation reaction by solid phase.

[0017]

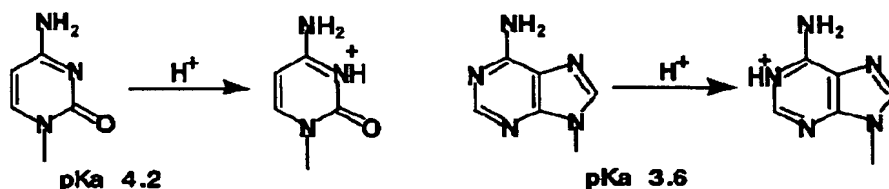
[Embodiment of the Invention] The synthesis method of the nucleic acid of this invention is the approach of compounding the nucleic acid concerned, without protecting the base part of a nucleic acid, and carries out the condensation reaction of the nucleotides under existence of a proton donor. In this invention, the proton donor was used, without dropping the reactivity to a hydroxyl group, in order that a proton donor may perform the condensation reaction of nucleotides smoothly because the reaction to a base part was controlled.

[0018] That is, by using a proton donor, a cytosine, an adenine base, etc. which pose a problem by side reaction are protonated, the reactivity of the amino group is lowered, and it becomes possible to control the reactivity to a base part.

[0019] In this invention, a proton donor will not be especially limited, if the reactivity to a hydroxyl group is dropped as mentioned above, it does not come and the reaction to a base part can be controlled. As a desirable property of a proton donor, it can mention that condensation ability is high, that there is no hygroscopicity, that the solubility to a reaction solvent is high, etc.

[0020] Furthermore, electric dissociation exponent of said proton donor can mention that it is 3.6 or less as a desirable property. this -- the following -- as shown in [Figure 1], protonation of an adenine, a cytosine base, etc. is because it happens by electric dissociation exponent 3.6 and electric dissociation exponent 4.2, respectively.

[Formula 1]



アデニン・シトシン塩基のプロトン化

[0021] That is, by using the low activator of electric dissociation exponent for a condensation reaction, by protonating a cytosine and an adenine base, the reactivity of the amino group is lowered and it becomes possible in this invention to control the reactivity to a base part.

[0022] In this invention, electric dissociation exponent of a proton donor is 3.6 or less preferably. electric dissociation exponent of a proton donor is three or less still more preferably. This is from the viewpoint that the reactivity of the amino group can be reduced while strengthening protonation of the base of a nucleic acid with [electric dissociation exponent] three [or less].

[0023] Moreover, as a proton donor, 4-nitrobenzimidazole truffle RATO, 4-nitro-6-(trifluoromethyl) benzotriazol-1-oar, or triazole truffle RATO can be mentioned from a viewpoint that the capacity to which the condensation reaction especially of the nucleotides is carried out is high.

[0024] The synthetic approach of the nucleic acid of this invention can be performed by carrying out the condensation reaction of a nucleoside and/or the nucleotides using the proton donor as base part the phosphoroamidite unit and activator which are not protected [so-called]. A non-protected base part phosphoroamidite unit is prepared by performing tritylation of 5' of sugar, and friend DAITO-ization of 3'. A conventional method can be used for these preparation.

[0025] In this invention, composition of a nucleic acid can be performed by the liquid phase and solid phase. First, the case where a nucleic acid is compounded by the liquid phase is explained.

[0026] In a liquid phase process, a condensation reaction can be performed in a suitable solvent using the base part phosphoroamidite unit which is not protected [above-mentioned] and an activator. As a solvent, THF, CH₃CN, dioxane, dimethoxyethane, DMF and DMA, N-methyl pyrrolidone, etc. can be mentioned. Especially reaction temperature is not limited but can perform a condensation reaction under a room temperature.

[0027] Moreover, solid phase support needs to be prepared of a solid phase technique

first. Especially solid phase support is not limited but the conventional things, such as a solid phase polymer and crystal bead support, can be used for it. A nucleotide is combined with solid phase support by the three-dash terminal, and a nucleotide is combined in order. Association of nucleotides is performed under existence of an above-mentioned proton donor and in a suitable solvent. As a solvent, THF, CH₃CN, dimethoxyethane, dioxane, DMF and DMA, N methyl pyrrolidone, etc. can be mentioned. Especially reaction temperature is not limited but can perform a condensation reaction under a room temperature.

[0028]

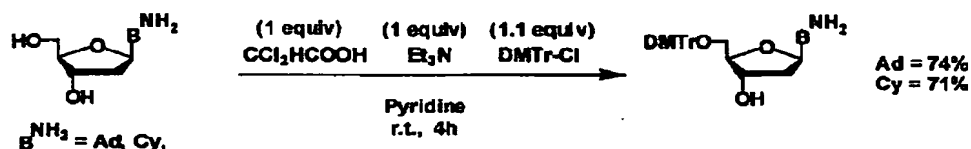
[Example] Hereafter, although an example explains this invention still more concretely, this invention is not the intention which limits to the following example and is interpreted.

[0029] In example 1 this example, composition of the nucleic acid in the liquid phase was tried.

[0030] When compounding DNA by the synthetic base part non-protected phosphoroamidite method of a base part non-protected phosphoroamidite unit, dA and dC from which the nucleobase part is not protected, deoxyguanosine (dG), and the friend DAITO unit of a thymine (T) are needed. Therefore, composition of the nucleoside by which only the 5'-hydroxyl group was first protected by the dimethoxytrityl (DMTr) radical was tackled.

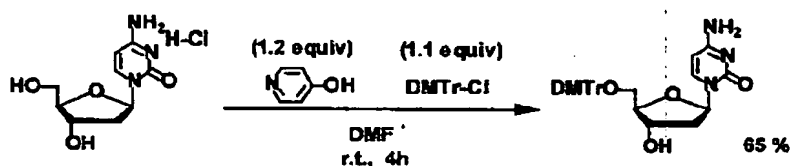
[0031] the hydroxyl group of dA and dC -- alternative tritylation is making the trityl chloride of an oversmall one react under existence of the dichloroacetic acid of the equivalent and triethylamine among a pyridine according to a conventional method The trityl object of dA and dC was acquired with 74% and 71% of yield at only 1 process, respectively (** 2). ** 2 -- the hydroxyl group of dA and dC -- the reaction of alternative tritylation is shown.

[Formula 2]



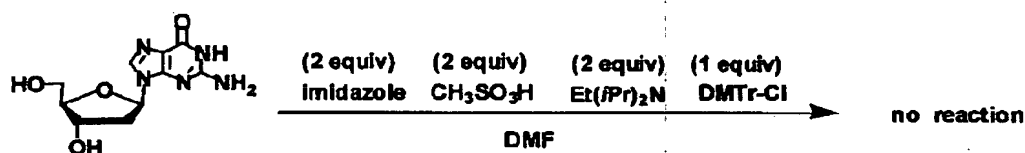
[0032] moreover -- the 4-hydroxy pyridine and trityl chloride of an oversmall one are even used only for dC among DMF -- a hydroxyl group -- it turned out that alternative tritylation is possible (** 3). ** 3 shows the reaction of hydroxyl-group alternative tritylation of dC which used the hydroxy pyridine.

[Formula 3]



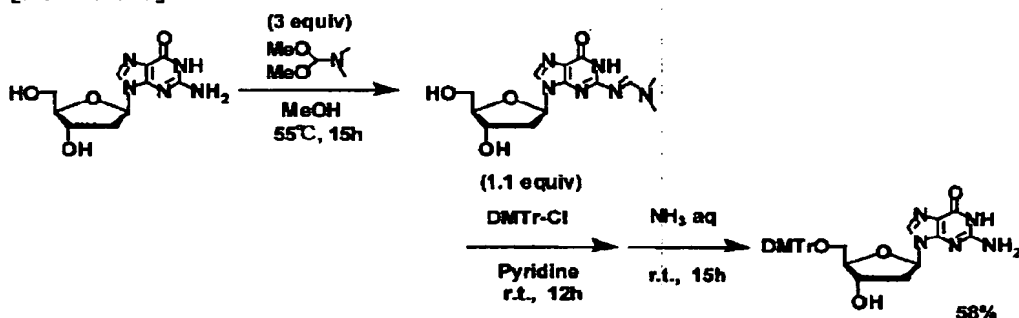
[0033] the hydroxyl group of dG — alternative tritylation is more difficult than dA and dC, and was not able to use the above technique. the past — Hayakawa and others — the hydroxyl group of dG — alternative tritylation is reported — **** (M.Kataoka, Y.Hayakawa, J.Org.Chem., 64.6087(1999).) — even if it performed same actuation, the reaction did not advance (** 4). ** 4 shows the reaction of hydroxyl-group alternative tritylation of reported dG by Hayakawa and others.

[Formula 4]



[0034] Then, if it restricts to dG, although some time and effort is taken, it is protecting the amino group of a base part temporarily by the protective group of an amidine mold, and the trityl object of dG with which the amino group of a base part has separated was isolated at 58% (** 5). ** 5 shows the reaction of hydroxyl-group alternative tritylation of dG.

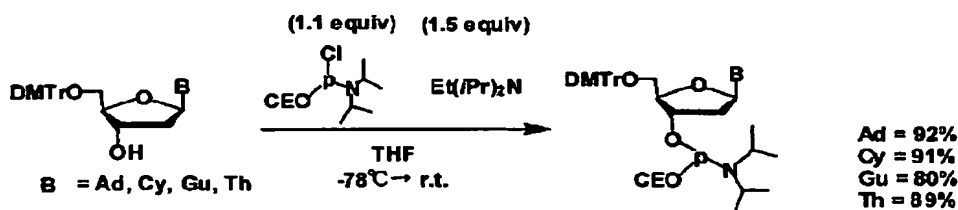
[Formula 5]



[0035] Thus, the trityl object of dA, compound dC, and compound dG and the trityl object of T compounded separately performed friend DAITO-ization using the chloro phosphine, respectively (2-cyano ethyl) (N and N-diisopropylamino). At this time, the side reaction of the reagent to the amino group of a base part is controlled by cooling

the system of reaction to -78 degrees C (** 6). ** 6 shows the reaction of the formation of friend DAITO of a DMTr nucleoside.

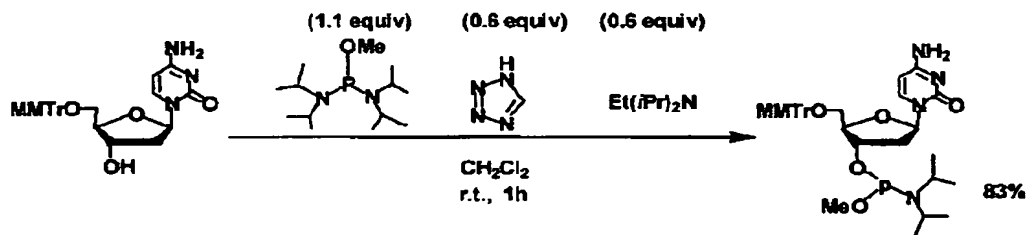
[Formula 6]



[0036] Moreover, in this research, synthetic examination of the oligonucleotide using the friend DAITO unit which used the stable mono-methoxytrityl (MMTr) radical for the 5'-hydroxyl group somewhat rather than the DMTr radical at the protective group at acid conditions is also performed. the conditions as DMTr-izing with the same MMTr-izing of a nucleoside -- using -- dA, dG, dC, and T -- it compounded at 75% of yield, 81%, 83%, and 93%, respectively. the bases dA, dG, dC, and T of the conditions as previously also with the continuing same formation of friend DAITO -- it compounded at 83% of yield, 71%, 85%, and 94%, respectively.

[0037] In a synthetic examination of the oligonucleotide of the example 4 mentioned later, in order to change the reactivity of the friend DAITO unit itself, the protective group of Lynn is changed into a methyl group from a cyano ethyl group, and the condensation reaction is performed. The friend DAITO unit from which the protective group of this Lynn is a methyl group was compounded with 83% of yield by making a chloro [bis(N and N-diisopropylamino)] methoxy phosphine react to the MMTr object of dC compounded previously (** 7). As for ** 7, the protective group of Lynn shows composition of the friend DAITO unit of a methyl group.

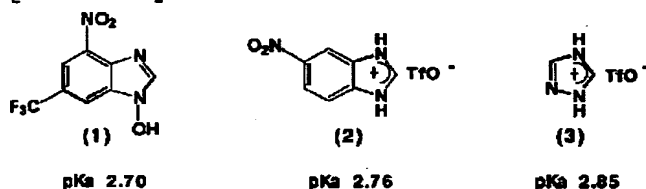
[Formula 7]



[0038] an activator -- composition -- this example -- **** -- an activator -- electric dissociation exponent -- solubility -- hygroscopicity -- and -- a friend -- DAITO -- a unit -- activation -- ability -- conditions -- filling -- a compound --

inside -- the following -- (--- one ---) - (--- three ---) -- a compound -- having used . Hereafter, the synthesis method of these activators is described.

[Formula 8]



[0039] 4-nitro-6-(trifluoromethyl) benzotriazol-1-ol was compounded with 55% of yield at three steps by using 1-chloro-2 and 6-dinitro-4-trifluoromethyl benzene as a start raw material, as shown in the following [Figure 9]. The detail about composition is as follows.

[0040] 4 -- it agitated at the room temperature under -- nitro-6-(trifluoromethyl) benzotriazol-1-ol argon atmosphere by dropping gradually the methanol solution (30ml) of sodium methoxide (7.5g 130mmol) at the methanol solution (80ml) of 4-chloro-3 and 5-dinitro benzotrifluoride (20g 74mmol). The hydrochloric-acid water solution (100ml) of 2M was added after 30 minutes, and the reaction solution was filtered. Filtrates were collected, reduced pressure distilling off of the solvent was carried out, and the target solid-state (2, 6-dinitro 4-trifluoromethyl anisole) was obtained.

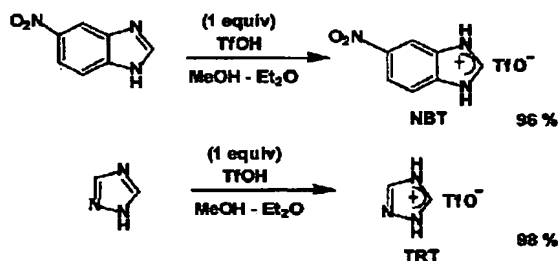
¹H NMR : 4.10 (s and 3H), 8.15 (s and 1H), 8.23 (s and 1H), [0041] After fully drying this solid-state, it dissolved in dehydrated ethanol (100ml). Next, the dehydrated ethanol (25ml) solution of hydrazine monohydrate (3.6ml 74mmol) was gradually dropped at this solution at 0 degree C under argon atmosphere. Then, churning was performed at 0 degree C for 1 hour, reduced pressure distilling off of the solvent was carried out, and the target solid-state (2, 6-dinitro 4-trifluoromethyl phenylhydrazine) was obtained.

[0042] ¹H NMR : 4.85 (s and 2H) and 8.41 (s and 2H), 9.67 Further (s and 1H) This 2, 6-dinitro 4-trifluoromethyl phenylhydrazine, Hydrazine monohydrate (3.6ml 74mmol), an acetic acid (16.9ml 296mmol), and sodium acetate trihydrate (35g 259mmol) are dissolved in the mixed solvent (100ml 2:1 v/v) of ethanol-water. Bottom 5 hours of argon atmosphere, Heating reflux was carried out. After cooling this reaction solution, it diluted with chloroform 200ml and 100ml of 0.1M hydrochloric-acid water solutions performed extract operation 3 times. Organic layers were collected, it dried and filtered with anhydrous sodium sulfate, reduced pressure distilling off of the solvent was carried out, and the specified substance (4-nitro-6-(trifluoromethyl)

benzotriazol-1-yl) was obtained. [(10g 55%) 0043] ^1H NMR : 4.72–4.98 (m and 1H) and 9.80 (s and 1H), 10.15 (s and 1H), ^{13}C NMR : 116.5 and 118.6, 122.8, 126.5, and 135.8, 138.0. Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$: C 33.88, H 1.22, N 22.58, F 22.97 Found : C 33.88, H 1.36, N 22.69, F 22.35 [0044] Solubility was high to organic solvents, such as acetonitrile and THF, at 2.70, and also electric dissociation exponent of this hydroxy triazole derivative (it is hereafter described as NT-HOBt) did not have hygroscopicity, and the activation ability of a friend DAITO unit was higher than the conventional activator. [Figure 9] shows composition of NT-HOBt. [Formula 9]

[0045] Composition of 4-nitrobenzoimidazo RINIUTORIFURATO (NBT) and thoria ZORINIUMUTORIFURATO (TRT) was able to be performed according to the example of a preparation report of benzoimidazo RINIUTORIFURATO (BIT) (Y. Hayakawa, M. Kataoka, and R. Noyori, J. Org. Chem., 61.7996 (1996)) of Hayakawa and others, and the specified substance was able to be compounded by high yield. ** 10 shows the composite reaction of NBT and TRT.

[Formula 10]



[0046] The detail about a synthesis method is as follows.

After dissolving 4-nitrobenzoimidazolium triflate (7.1g 44mmol) in the mixed solvent (50ml 1:1 v/v) of the methanol-ether, while 0 degree C cooled, trifluoromethanesulfonic acid (3.9ml 44mmol) was dropped gradually, and it agitated. Then, it was made to crystallize by opening a reaction solution in the ether (200ml), and the solid-states were filtered and collected. [(13.2g 96%) 0047] Melting point 138–140-degree-C(ethyl acetate) ^1H NMR : 7.97 (d, 1H, and J = 8.91Hz), 8.30–8.34 (m and 1H) and 8.63 (d, 1H, and J = 2.16 Hz), 9.51 (s, 1H) ^{13}C NMR : 111.7, 115.5, and 120.5, 131.8, 135.8, 144.7, 145.4. Anal. Calcd for $\text{C}_8\text{H}_6\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C 30.68, H 1.93, N 13.42, F 18.20, and S 10.24 Found : C 30.60, H 1.91, N 13.44, F 18.28, S 9.21 [0048] After dissolving 1, 2, and 4-thoria ZORINIUMUTORIFURATO triazole (3.0g 44mmol) in the

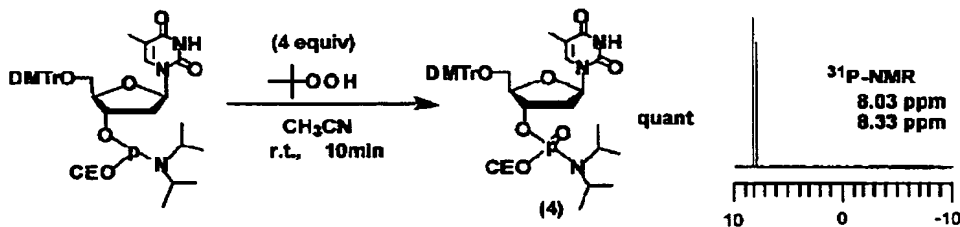
mixed solvent (50ml 1:1 v/v) of the methanol-ether, while 0 degree C cooled, truffle
 RATO (3.9ml 44mm) was dropped gradually, and it agitated. Then, it was made to
 crystallize by opening a reaction solution in the ether (200ml), and the solid-states
 were filtered and collected. [(9.4g 98%) 0049] Melting point:
 162-164-degree-C(ethyl-acetate-acetonitrile) ¹H NMR : 9.31 (s, 1H), 9.33 13(s, 1H) C
 NMR : 142.85 Anal. Calcd for C₃H₄F₃N₃O₃S : C 16.4, H 1.84, N 19.17, F 26.01, S
 14.63 Found : C 16.33, H 1.75, N 19.35, F 25.82, S 14.3 [0050] electric dissociation
 exponent of NBT was 2.76 and solubility, hygroscopicity, and its activation ability were
 ideal like NT-HOBt. Although it was poorly soluble a little about TRT, electric
 dissociation exponent was 2.85, and there was no hygroscopicity and it was high. [of
 activation ability]

[0051] In synthetic this example of the dimer in the liquid phase, the TpC dimer in the
 liquid phase by the base part non-protected phosphoroamidite method was
 compounded using the friend DAITO unit and activator which were compounded as
 mentioned above, and the comparison with the conventional activator was performed.

[0052] As for the amino group of a cytidine, the past knowledge shows that side
 reaction tends to occur from the height of the nucleophilicity. Then, in order to check
 the condensation ability of a new activator, the TpC dimer was compounded by the
 liquid phase this time.

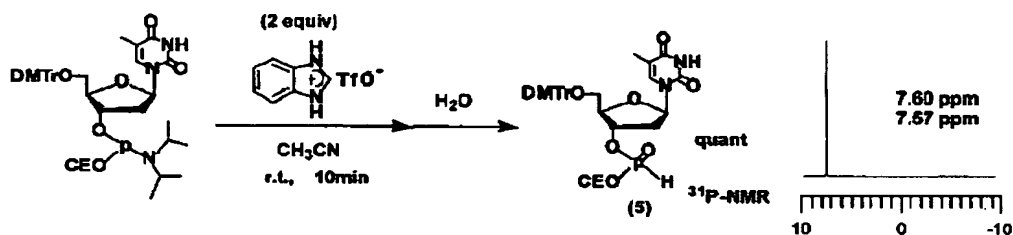
[0053] First, in order to make a reaction easy to follow by ³¹P-NMR, the by-product
 under condensation reaction was compounded in advance, and it started with
 calculating the numeric value of ³¹P-NMR. As shown in [-izing 11], the compound (4)
 was able to be quantitatively obtained by making a peroxide react to a friend DAITO
 unit. The value of the ³¹P-NMR was 8.03 or 8.33 ppm. ** 11 shows ³¹P-NMR of
 composition of a compound (4), and a compound (4).

[Formula 11]



[0054] H-phosphonate object (5) was able to be compounded almost quantitatively by
 using benzimidazole truffle RATO (7.60 or 7.57 ppm).

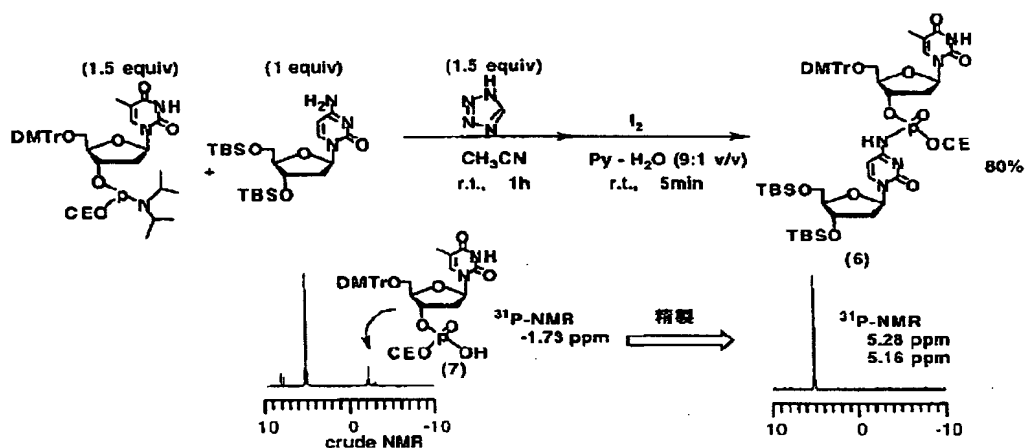
[Formula 12]



** 12 shows ³¹P-NMR of composition of a compound (5), and a compound (5).

[0055] Moreover, the friend DAITO unit was able to be made to have been able to react to the cytidine derivative from which the amino group is not protected by the ability having used tetrazole as the activator, and the friend date object (6) was able to be compounded with 80% of yield. (5.28 or 5.16 ppm) .

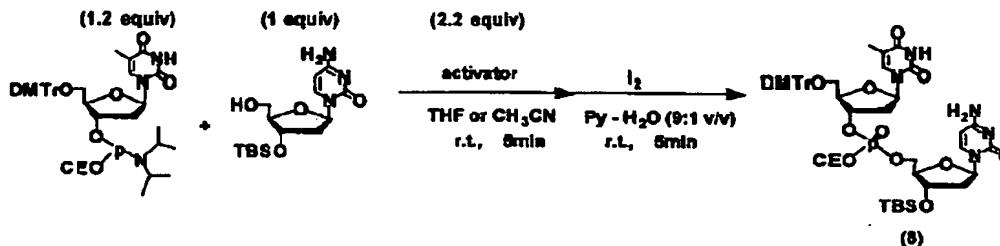
[Formula 13]



** 13 shows ³¹P-NMR of composition of a compound (6), and a compound (6).

[0056] It referred to the value of these ³¹P-NMR, and the activator in subsequent dimer composition was evaluated. After composition of a TpC dimer used the 1.2Eq unit and the 2.2Eq activator for the cytidine which protected the 3'-hydroxyl group compounded separately by the TBS radical and carried out condensation in a room temperature and 5 minutes, it performed iodine oxidation. S-ethyl tetrazole and benzimidazole truffle RATO which have an example of a report by current for a comparison besides three sorts of new compounds were used for the activator.

[Formula 14]



[0057] ** 14 shows composition of the TpC dimer in the liquid phase. Since the activation ability of S-ethyl tetrazole was not not much high, it was able to see the compound (4) which oxidized while having not activated in the condensation reaction for 5 minutes. Therefore, the isolation yield of the TpC dimer at this time was not not much so high as 68%. Moreover, since the peak which has the chemical shift of the value near a friend date object (6) in this system of reaction is not acquired, it turns out that the side reaction to a base part is not starting. This has suggested that the direction of a first-class hydroxyl group has high reactivity overwhelmingly, when the amino group and the first-class hydroxyl group of a base part are compared in a HOSUFICHIRU-ized reaction. The approach of compounding DNA can also call it the base part-less protecting method using this reactant difference. Drawing 1 shows the result which the TpC dimer which used S-ethyl tetrazole compounded.

[0058] Moreover, as shown in drawing 2, both NBI and NT-HOBt which are the activator used newly, and TRT were able to compound the TpC dimer by 94 and 83 or 95% high yield, respectively, without causing the side reaction to a base part.

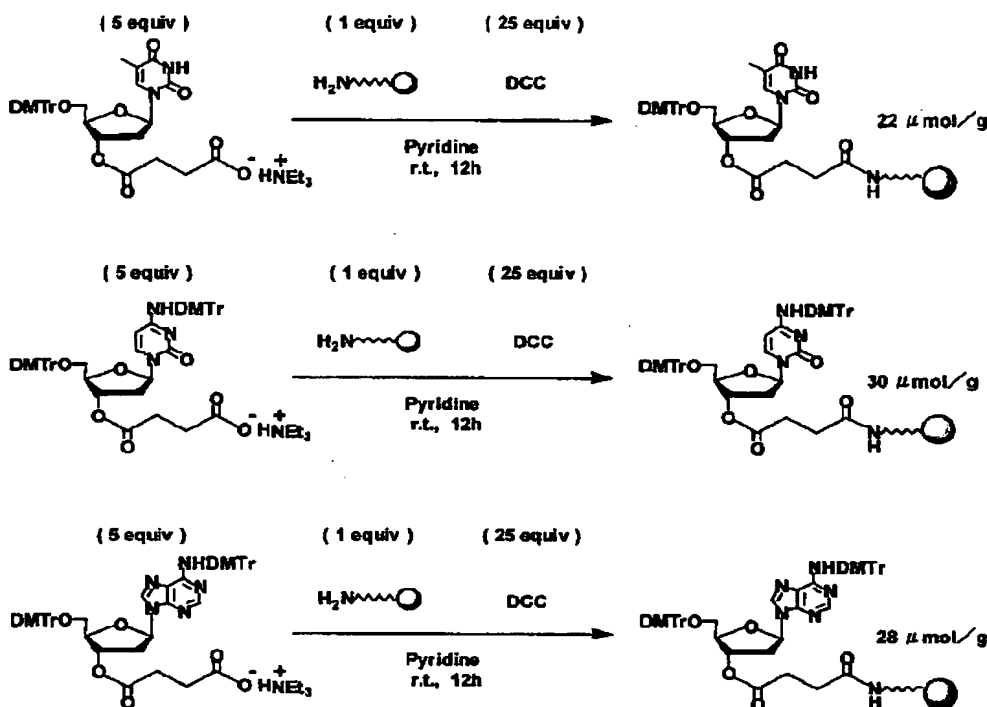
[0059] Even if it uses the activator compounded newly this time for the condensation reaction of the conditions which do not use a protective group for the amino group of a base part among the liquid phase from the above thing, it can be said that a DNA dimer is compoundable with sufficiently high yield, without causing side reaction.

[0060] Composition of the nucleic acid in an example 2, next solid phase was tried. At this example, at the reaction in the liquid phase, the new activator with which side reaction was not observed was used for the reaction on the solid phase which uses a superfluous unit, and the side reaction to a nucleobase part was observed by HPLC.

[0061] The support used by this research as solid phase support for preparation solid phase composition of solid phase support is polystyrene 26 whenever [viaduct]. In this solid phase carrier surface, the first-class amino group of about 35micromol/g existed, and the nucleoside which used and carried out succinyl linker ** of a condensing agent and the DCC was introduced into this reacting point this time at it. Moreover, the amino group of the base part of a cytidine and an adenosine is

protected by the DMTr radical in this case. ** 15 shows preparation of solid phase support.

[Formula 15]



[0062] Composition of ApT and a CpT dimer was performed using the solid phase support into which synthetic **** of a dimer and the thymidine compound previously were introduced. A composite cycle is as being shown in Table 1, and the evaluation was performed using Opposition HPLC.

[Table 1]

操作	試薬	時間
1 洗浄	CH ₂ Cl ₂	
2 脱DMTr化	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	30 sec
3 縮合	アミダイトユニット(20 equiv) 活性化剤 (40 equiv)	1 min
4 洗浄	CH ₃ CN	
5 酸化	I ₂ /Py - H ₂ O (9:1, v/v)	2 min
6 洗浄	CH ₃ CN	
切り出し	conc NH ₃ aq	40 min

[0063] In composition of ApT, analysis by Opposition HPLC is performed also about the case where the tetrazole and BIT other than [for a comparison] three sorts of compounds of NT-HOBt, and TRT and NBT newly used as an activator this time are used. First, UV wave measured with the opposition HPLC chart and photodiode array detector of ApT to reference of analysis at coincidence is shown. The opposition HPLC chart which carried out synthetic examination on solid phase is shown in drawing 4. Moreover, the conditions of Opposition HPLC are shown below.

[0064] Waters 3D UV detector was connected and used for opposition HPLC Waters Alliance system. An operating condition is shown below.

((A) Conditions)

Column temperature : 50-degree-C mobile phase : solution A: 0.1 M Ammonium acetate (pH 7.0) solution B : Acetonitrile (B: 0-10%linear gradient) Flow rate : 1.0 ml / min.

Analysis time amount : 30 min (conditions B)

Column temperature : 50-degree-C mobile phase : solution A: 0.1 M Ammonium acetate (pH 7.0) solution B : Acetonitrile (B: 0-30%linear gradient) Flow rate : 1.0 ml / min.

Analysis time amount : 30 min [0065] Tetrazole is widely used for the solid phase composition using the friend DAITO unit from which the base part was protected. The HPLC chart when performing a condensation reaction using this tetrazole is an entry 1. Many peaks of the side reaction product to a base part other than the target dimer can be observed. This shows that a base part must be protected, in order to use tetrazole for an activator.

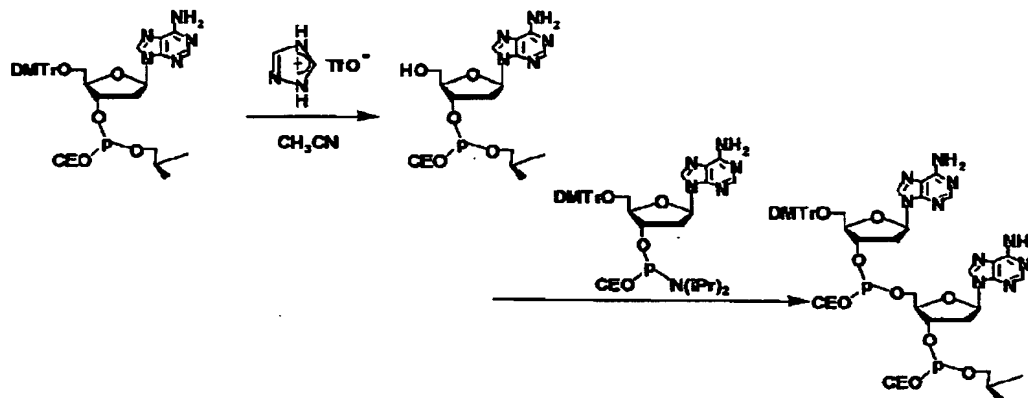
[0066] Moreover, although or is decreased a little rather than the time of using tetrazole at a liquid phase reaction at BIT by which the side reaction to a base part was not observed, the peak of the same side reaction product is acquired (entry 2).

[0067] It is an HPLC chart when using for a condensation reaction by using as an activator NT-HOBt compounded this time by the entry 3. The side reaction to a base part is controlled farther than the conventional activator used by the entry 1 or 2. However, it was observed although the peaks of the side reaction product same to the field for holding-time 27 minutes as tetrazole or BIT were few.

[0068] As mentioned above, solubility of TRT is bad to a THF solvent like tetrazole, and it is reaction ***** only in an acetonitrile solvent. The opposition HPLC chart then obtained is an entry 4. By the entry 4, although the side reaction product seen by the entry 1-3 was decreasing considerably, it has observed the peak immediately after

the specified substance ApT apart from these peaks. ** 16 shows the condensation reaction following the desorption of a DMTr radical and it by the activator.

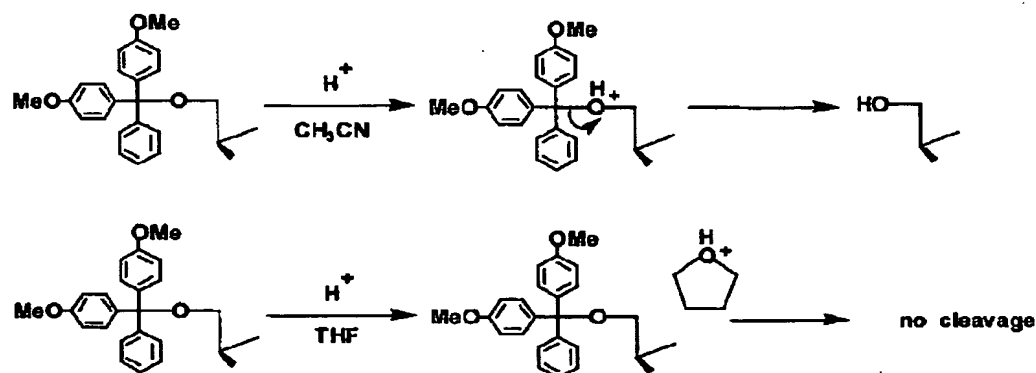
[Formula 16]



[0069] The peak which was common in this can also check an entry 5. This peak is considered to be the ApApT trimer to which chain length was further extended not by the side reaction from that holding time and UV wavelength to a base part but by the desorption of a DMTr radical.

[0070] By the entry 6, it is a result when performing a condensation reaction by using NBT as an activator among a THF solvent. No peak of the side reaction object mentioned above was observed, but was able to compound the target ApT dimer at 99% or more of rate of condensation. ** 17 shows a difference of the behavior of the DMTr radical by the solvent.

[Formula 17]



[0071] The reason the desorption of the DMTr radical observed by the entry 5 was not seen by the entry 6 is considered that the DMTr radical has stopped being able to **** comparatively easily in the conditions of an entry 6 due to the buffer

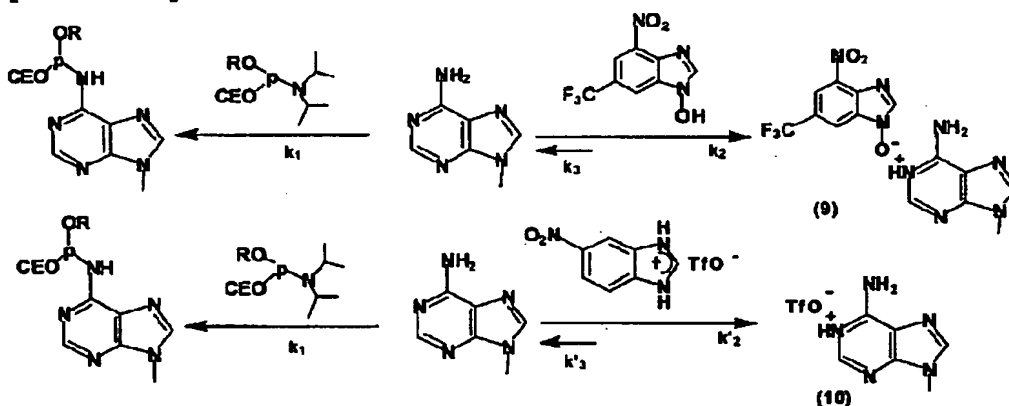
effectiveness of THF as described at [-izing 17].

[0072] Moreover, by the comparison of an entry 3 and an entry 6, although electric dissociation exponent is an almost equivalent activator, two possibility can be considered about the reason only the direction of NT-HOBt causes side reaction.

[0073] The first is the explanation which paid its attention to the difference in the opposite anion at the time of an adenine base being protonated. As shown in [-izing 18], on condition that an entry 6, the adenine base forms the salt with truffle RATO which is strong acid. On the other hand, by the entry 3, it is salt formation with the activator itself which is weak acid.

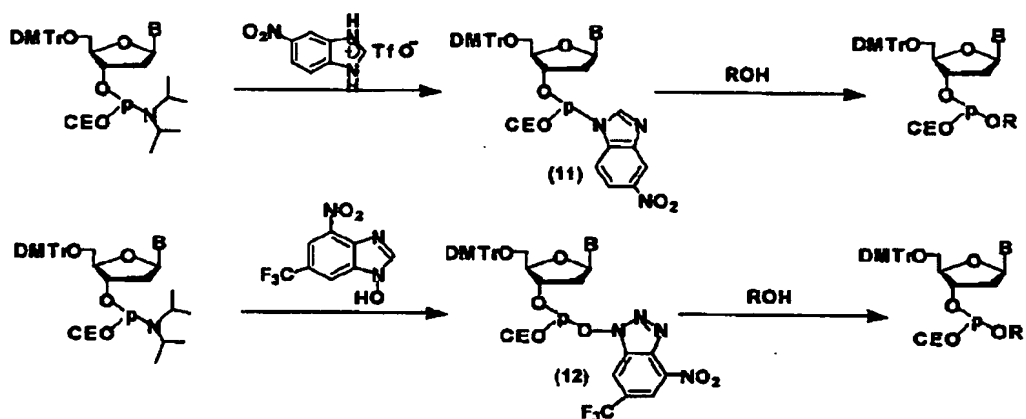
[0074] Here, it is $k_1, k_3 \ll k_2$ and $k_1, k_3 \ll k'_2$. However, k_3 Since the life in the direction of (10) is long, although it is larger than k'_3 , and side reaction is not observed by the entry 6 from (9), it is thought by the entry 3 that some side reaction started. ** 18 shows the difference in the opposite anion at the time of an adenine base being protonated.

[Formula 18]



[0075] The second pays its attention to the activity intermediate field of a condensation reaction. It goes via the friend DAITO mold (9) in which activity intermediate field have P-N association like [-izing 19] on condition that the entry 6. The intermediate field of this friend DAITO mold are generated also when other azoles are used as an activator. However, in NT-HOBt, a reaction advances via the intermediate field (10) of the phosphite mold instead of such a friend DAITO mold. Since the reactivity of this intermediate field is completely different, by the entry 3, explanation of not being observed at all is also considered for the side reaction observed by the entry 6. ** 19 shows a difference of activator **** intermediate field.

[Formula 19]



[0076] Next, the CpT dimer was compounded in the same synthetic cycle as an ApT dimer using the above-mentioned new activator. The opposition HPLC chart is shown in drawing 5. a new activator -- the desorption of the side reaction and the DMTr radical to the base part which was set at ApT composition in the case of which has compounded the CpT dimer at the high rate of condensation, without observing. Incidentally, the peak for holding-time 22 minutes of an entry 7 and the peak for holding-time 4 minutes of an entry 8 are not the thing of the nucleic-acid origin but peaks of the solvent origin.

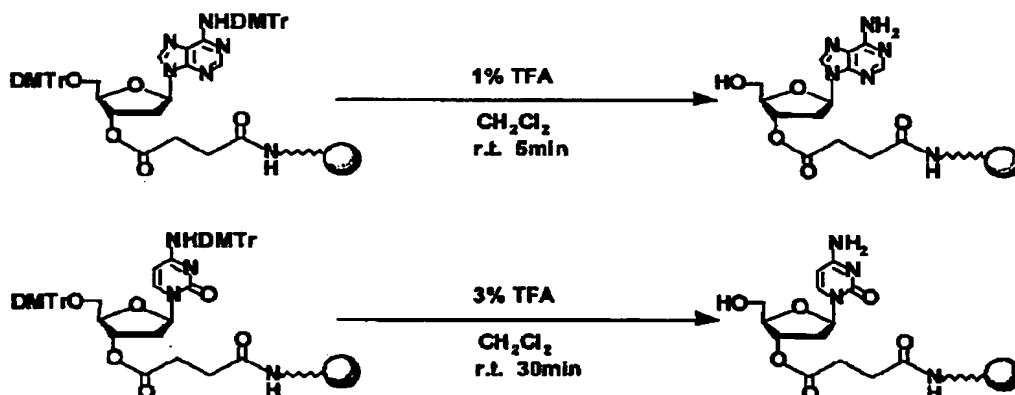
[0077] Moreover, even if it used NBT in the acetonitrile solvent, the desorption of a DMTr radical like an entry 5 was not observed. It is thought that the DMTr radical has stopped being desorbed from the desorption of a DMTr radical not having been seen in composition of these CpT easily since the basicity of a cytosine base is higher than an adenine base.

[0078] Moreover, side reaction will not be seen by the entry 7, because it is more stable than the case where the condition that the cytosine base was protonated by NT-HOBt since the basicity of a cytosine base was higher than an adenine base is an adenine base, as above-mentioned.

[0079] Although the condensation reaction using NT-HOBt and TRT has pointed out some troubles from the result of old CpT and ApT composition, the specified substance was compoundable at the high rate [be / no side reaction] of condensation with the condensed system which used NBI in the THF solvent. Hereafter, it focused on this activator and synthetic examination of ApA, CpC, and GpT was performed. In composition of ApA and CpC, it was used as solid phase support which introduced dA or dC into the end prepared by 3-2. Although the amino group of the base part of dA-dC introduced into the end is protected by the DMTr

radical, it needs the acid treatment of long duration for the deprotection of this DMTr radical rather than the case of the deprotection of the DMTr radical of a hydroxyl group. This time, according to the example of a report of Wada and others, dC processed for 30 minutes with the 3%TFA-dichloromethane solution for 5 minutes with the 1%TFA-dichloromethane solution, respectively, and dA performed deprotection. ** 20 shows the reaction of the deprotection on the solid phase of the DMTr radical introduced into the amino group of a base part.

[Formula 20]



[0080] Although the solid phase composition cycle is the same as that of the time of previous ApT composition fundamentally, only nitro bends imidazolium TORIFURATO is used as an activator this time. Moreover, in the condensation using dG friend DAITO, since a trityl radical tends to **** since there is almost no basicity in a guanine base, and the past knowledge shows, as for a guanine base, not causing side reaction and it is not necessary to protonate a base part, only 20Eq of a friend DAITO unit and the equivalent of activators is not used. It starts below and the opposition HPLC chart of ApA, CpC, and GpT which is not refined [immediately after and] is shown in drawing 6 .

[0081] The specified substance was able to be compounded without causing side reaction at the high rate of condensation again in which case.

[0082] In synthetic examination this example of the DNA tetramer using example 3NBT as an activator, synthetic examination of the DNA tetramer using NBT as an activator was performed. It was made to react for 1 minute like the time of dimer composition using 20Eq of units, and 20Eq of NBT in dG at a condensation reaction step in dA and dC, using 20Eq of units, and 40Eq of NBT. It was the same as composition of the dimer which also mentioned the synthetic cycle above, iodine processing was carried out to oxidation, and logging from solid phase performed

ammoniation. It starts to drawing 7 and the opposition HPLC of AAAT which is not refined [immediately after and], CCCT, and GGGT is shown. The synthetic result on the solid phase of GGGT which used NBT for drawing 8 is shown.

[0083] Consequently, composition of a tetramer could also elongate chain length at high condensation effectiveness, and most side reaction to the base section was not observed. The mass spectrum is performing the check of these peaks. As seen by the entry 6 and 9–15, when NBT was used as an activator, the base part was able to perform chain expanding satisfactory at all to the tetramer also under the conditions of not protecting. By the base part non-protected phosphoroamidite method, it is the first thing, and although things were made as for this to the target to skip the step which carries out cleavage removal of the P–N association which was required for the technique to the former, and which is produced as a result of side reaction, and to compound a DNA oligomer, it is not an overstatement.

[0084] In synthetic examination this example of the DNA oligonucleotide using example 4NBT as an activator, 39 (CAA) **** are compounded for DNA synthesis examination of longer chain length. The protective group of 5' hydroxyl group is using the friend DAITO unit whose protective group of the Lynn part is a cyano ethyl group by the DMTr radical, using the solid phase composition cycle (Table 1) which mentioned synthetic conditions above. Non-refined anion-exchange HPLC is shown in an entry 16 immediately after logging at that time.

[0085] Although the peak of the target 9 **** was observed by Maine, chain length's long side reaction product became a problem from the specified substance which was not observed in the DNA synthesis to a tetramer by this composition. This side reaction does not appear only within the array 3 (CAA), and is observed also in the composition of C6T shown below.

[0086] Reducing the class and chain length of a base of the purpose compound compounded C6T here, and it is for simplifying analysis of a reaction more. The protective group of 5' hydroxyl group is using the friend DAITO unit whose protective group of the Lynn part is a cyano ethyl group by the DMTr radical, using the solid phase composition cycle (Table 1) which mentioned synthetic conditions above. Also in this case, (CAA) like the time of 3, although the peak of the target 7 **** was observed by Maine, the side reaction product with chain length longer than the specified substance was seen.

[0087] Then, in order to control this side reaction, two actuation is performed this time. In the first actuation, the protective group of 5' hydroxyl group of a friend DAITO unit was changed to the MMTr radical from the DMTr radical, and the condensation

reaction was performed. Another is performing the condensation reaction using the friend DAITO unit which changed the protective group of the Lynn part into the methyl group from the cyano ethyl group. It is to have performed actuation which changed the protective group of 5' hydroxyl group of a friend DAITO unit to the MMTTr radical from the DMTr radical from concern whether did the desorption of a DMTr radical occur and accumulate during the condensation reaction, and the side reaction product with chain length longer than the specified substance was observed. Although the solid phase composition cycle (Table 2) mentioned later is used for the synthetic conditions at this time, this has set up the reaction time of detritylation for a long time as compared with the synthetic cycle used until now.

[Table 2]

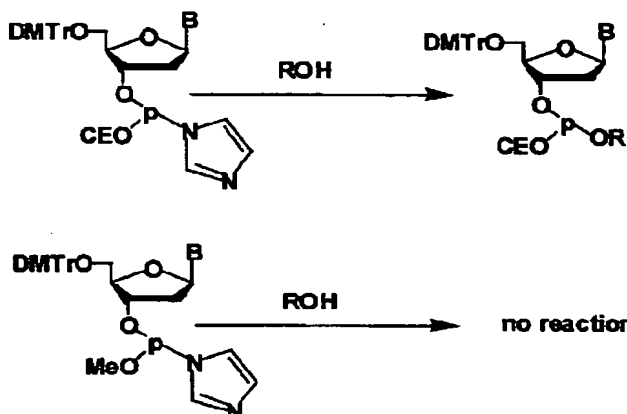
	操作	試薬	時間
1	洗浄	CH ₂ Cl ₂	
2	脱DMTr化	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	2 min
3	縮合	アミダイトユニット(20 equiv) 活性化剤 (40 equiv)	1 min
4	洗浄	CH ₃ CN	
5	酸化	I ₂ /Py - H ₂ O (9:1, v/v)	2 min
6	洗浄	CH ₃ CN	
	切り出し	conc NH ₃ aq	40 min

[0088] Non-refined anion-exchange HPLC is shown in an entry 18 immediately after logging of C6T compounded using this synthetic cycle. As the chart of drawing 11 shows, a side reaction object is not different from before at all, and is observed more back than the Maine peak. This showed that this side reaction was not starting by the desorption of a trityl radical.

[0089] before -- Letsinger et al. (S.M.Gryaznov, R.L.Letsinger, J.Am.Chem.Soc., 113, and 5876(1991). --) S.M.Gryaznov, R.L.Letsinger, Ncleic Acids Res., 20, and 1879(1992). Even if the protective group of the Lynn part activates the friend DAITO unit which is a methyl group and changes into an imidazolid object, with alcohol, it is checking not reacting by 31 P-NMR. It also turns out that it reacts with alcohol and the imidazolid object which, on the other hand, activated the friend DAITO unit whose protective group of the Lynn part is a cyano ethyl group forms phosphite. [-izing 21] shows the effect which the protective group of the Lynn part has on a

HOSUFICHIRU-ized reaction.

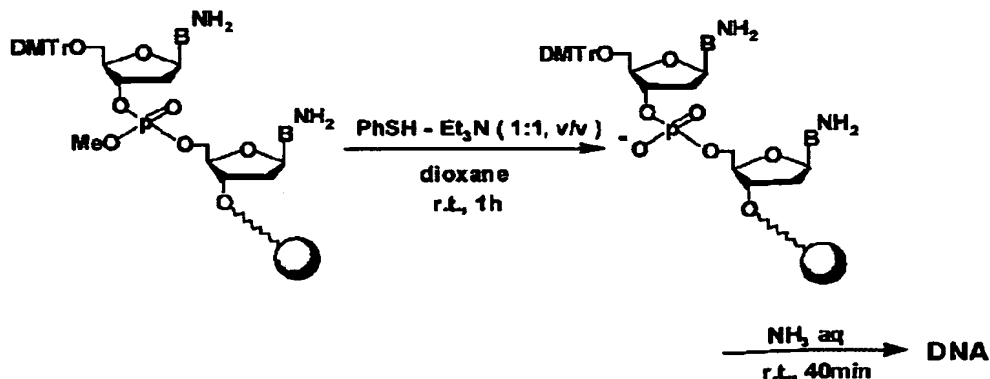
[Formula 21]



[0090] That is, the effect which the protective group of the Lynn part has on a HOSUFICHIRU-ized reaction will be large, and will change the reactivity of a friend DAITO unit fairly. Then, the condensation reaction was performed using the friend DAITO unit which changed the protective group of the Lynn part into the methyl group from the cyano ethyl group as one actuation in which I accept it in order to control the side reaction to a base part based on such knowledge. It is the purpose to make reactivity of a friend DAITO unit low and to control the reaction to a base part.

[0091] Although beta elimination of the cyano ethyl group used until now is carried out by ammoniation and deprotection is carried out, as shown in [-izing 22], benzenethiol processing is performed on solid phase here for demethylation. After performing this processing for 1 hour, the usual logging actuation was performed and the resultant was acquired. ** 22 shows the reaction of the demethylation on solid phase.

[Formula 22]



The synthetic cycle at this time is shown in Table 3.

[Table 3]

操作	試薬	時間
1 洗浄	CH ₂ Cl ₂	
2 脱DMTr化	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	2 min
3 縮合	アミダイトユニット(20 equiv) 活性化剤 (40 equiv)	1 min
4 洗浄	CH ₃ CN	
5 酸化	I ₂ /Py - H ₂ O (8:1, v/v)	2 min
6 洗浄	CH ₃ CN	
脱保護	PhSH - Et ₃ N - dioxane (1:1:2, v/v/v)	1 h
切り出し	conc NH ₃ aq	40 min

The composition (anion-exchange HPLC) on the solid phase of C6T using NBT is shown in drawing 12.

[0092]

[Effect of the Invention] According to the synthesis method of the nucleic acid of this invention, the advantageous effectiveness that a desired nucleic acid can be compounded more quickly and correctly is done so.

[0093] Moreover, according to the synthesis method of the nucleic acid of this invention, since a composite process can be shortened, the advantageous effectiveness that a nucleic acid can be compounded simpler is done so.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-2895

(P2003-2895A)

(43) 公開日 平成15年1月8日(2003.1.8)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

A 4 B 0 2 4

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A 4 C 0 5 7

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2001-162896(P2001-162896)

(22) 出願日 平成13年5月30日(2001.5.30)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月15日
社団法人日本化学会発行の「日本化学会第79春季年会
(2001) 講演予稿集 I I」に発表

(71) 出願人 391012316

東京工業大学長

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号

(72) 発明者 関根 光雄

神奈川県横浜市青葉区藤が丘2-41-21-303

(72) 発明者 清尾 康志

神奈川県相模原市上鶴間6-7-34 ハイ
ツ K I 1-102

(74) 代理人 100072051

弁理士 杉村 興作 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の合成法

(57) 【要約】

【課題】 より迅速、かつ、正確に核酸を合成すること
を提供することにある。

【解決手段】 本発明の核酸の合成法は、核酸の塩基部
分を保護せずに当該核酸を合成する方法であって、プロ
トン供与体の存在下、ヌクレオチド同士を縮合反応させ
ることを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸の塩基部分を保護せずに当該核酸を合成する方法であって、プロトン供与体の存在下、ヌクレオチド同士を縮合反応させてリン酸エステル結合させることを特徴とする核酸の合成法。

【請求項2】 前記プロトン供与体のpKaが、3.6以下であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記プロトン供与体が、4-ニトロベンズイミダゾールトリフラート、4-ニトロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゾトリアゾール-1-オール、又はトリアゾールトリフラートからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項1又は2項に記載の方法。

【請求項4】 前記縮合反応を液相で行うことを特徴とする請求項1~3項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記縮合反応を固相で行うことを特徴とする請求項1~3項のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業の利用分野】本発明は、核酸の合成法に関し、特に核酸の塩基部分を保護せずに当該核酸を合成する核酸の合成法に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸の合成法は、核酸を人工的に合成する技術であり、例えば、ある特定のDNAプライマーを人工的に合成する際に必要な技術である。また、PCRを用いれば、人工のDNAプライマーを使って目的とする遺伝子を増幅することもできる。

【0003】核酸合成の骨子は、保護基をつけたヌクレオチドのリン酸基を活性化して、他のヌクレオチドの水酸基とリン酸エステル結合させることである。

【0004】現在までに、核酸の合成法として、ホスホルアミダイト法が良く知られている。ホスホルアミダイト法は、固相法的一种であり、ポリスチレンなどの固体(支持体)にヌクレオチドを結合させ、それを鎖伸長していくことによって合成中間体の単離を簡単にする方法である。この方法は、反応に用いた試薬、過剰のヌクレオチドなどは支持体を洗浄するだけで除去される利点がある。合成され支持体についている目的物は、最後に支持体から切り離されクロマトグラフィーなどで精製される。

【0005】また最近では、核酸塩基部位に保護基を使用しない条件下、DNAオリゴマーを構築できる塩基部位無保護アミダイト法が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述のホスホルアミダイト法は、核酸塩基部のアミノ基にアシル型の保護基を使用することを前提とする。このため、最終目的物を得るためにこの保護基を脱保護する必要があり、一般に脱保護を55℃で長時間のアンモニア処理を

行っている。しかし、このアンモニア処理のような塩基性の条件を用いると、標的化合物が不安定な場合、目的物が分解し、合成収率、純度の低下をもたらす。

【0007】また、塩基部が保護されたヌクレオチドのグリコシド結合は、酸性条件下において不安定であり、無保護体と比較してアデノシンとグアノシンでは脱プリン化反応が起こりやすい。

【0008】したがって、核酸の塩基部位のアミノ基を保護しないで、核酸を合成することが好ましい。

【0009】しかしながら、上述の無保護アミダイト法では、デオキシシチジン(dC)とデオキシアデノシン(dA)塩基部位にも縮合反応が起こることが知られており、そのため、1サイクル毎にこの副反応の結果生じるP-N結合を開裂除去する余分な工程が必要とされる。P-N結合を除去するには、例えば、塩基部位のアミノ基へのホスファチル化体のP-N結合をベンズイミダゾールトリフラート存在下メタノールと反応させるなどの工程が必要であった。しかし、このような工程を必要とするより迅速に所望の核酸を合成することができない。したがって、より迅速に核酸を合成する方法が望まれていた。

【0010】そこで、本発明の目的は、より迅速、かつ、正確に核酸を合成する方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、発明者らは、種々の縮合剤を合成し、縮合反応について鋭意研究を積み重ねた結果、所望の核酸を迅速かつ正確に合成できることを見出した。

【0012】本発明の核酸の合成法は、核酸の塩基部分を保護せずに当該核酸を合成する方法であって、プロトン供与体の存在下、ヌクレオチド同士を縮合反応させることを特徴とする。

【0013】本発明の核酸の合成法の好適な実施態様において、前記プロトン供与体のpKaが、3.6以下であることを特徴とする。

【0014】本発明の核酸の合成法の好適な実施態様において、前記プロトン供与体が、4-ニトロベンズイミダゾールトリフラート、4-ニトロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゾトリアゾール-1-オール、又はトリアゾールトリフラートからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0015】本発明の核酸の合成法の好適な実施態様において、前記縮合反応を液相で行うことを特徴とする。

【0016】本発明の核酸の合成法の好適な実施態様において、前記縮合反応を固相で行うことを特徴とする。

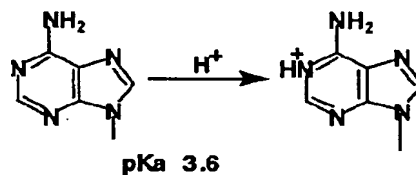
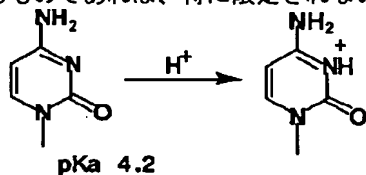
【0017】

【発明の実施の形態】本発明の核酸の合成法は、核酸の塩基部分を保護せずに当該核酸を合成する方法であって、プロトン供与体の存在下、ヌクレオチド同士を縮合反応させる。本発明において、プロトン供与体を用いた

のは、プロトン供与体が、ヌクレオチド同士の縮合反応を円滑に行うために水酸基への反応性を落とすことなく、かつ塩基部位への反応性を抑制し得るからである。

【0018】即ち、プロトン供与体を用いることにより、副反応で問題となるシトシン、アデニン塩基などをプロトン化してアミノ基の反応性を下げ、塩基部位への反応性を抑制することが可能となる。

【0019】本発明において、プロトン供与体は、上述のように水酸基への反応性を落とすことなく、塩基部位への反応性を抑制し得るものであれば、特に限定されない。



アデニン・シトシン塩基のプロトン化

【0021】即ち、本発明においては、pKaの低い活性化剤を縮合反応に用いることにより、シトシン、アデニン塩基をプロトン化することにより、アミノ基の反応性を下げ、塩基部位への反応性を抑制することが可能となる。

【0022】本発明においては、プロトン供与体のpKaは、好ましくは、3.6以下である。プロトン供与体のpKaは、さらに好ましくは、3以下である。これは、pKaが3以下であれば、核酸の塩基のプロトン化を強化すると共に、アミノ基の反応性を低減できるという観点からである。

【0023】また、特にヌクレオチド同士を縮合反応させる能力が高いという観点から、プロトン供与体としては、4-ニトロベンズイミダゾールトリフラート、4-ニトロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゾトリアゾール-1-オール、又はトリアゾールトリフラートを挙げることができる。

【0024】本発明の核酸の合成方法は、いわゆる塩基部位無保護のホスホロアミダイトユニットと活性化剤としてのプロトン供与体を用いて、ヌクレオシド及び／又はヌクレオチド同士を縮合反応させることにより行うことができる。塩基部位無保護のホスホロアミダイトユニットは、糖の5'のトリチル化、及び3'のアミダイト化を行うことにより調製する。これらの調製には、常法を用いることができる。

【0025】本発明において、核酸の合成は、例えば、液相及び固相で行うことができる。まず、核酸の合成を液相で行った場合について説明する。

【0026】液相法では、上述の塩基部位無保護のホスホロアミダイトユニットと、活性化剤とを用いて、適当な溶媒中で縮合反応を行うことができる。溶媒としては、THF、CH₃CN、ジオキサン、ジメトキシエタン、DMF、DMA、N-メチルピロリドン等を挙げることが

できる。プロトン供与体の好ましい性質としては、縮合能が高いこと、吸湿性がないこと、反応溶媒への溶解性が高いことなどを挙げることができる。

【0020】さらに、好ましい性質として、前記プロトン供与体のpKaが、3.6以下であることを挙げることができる。これは、下記【化1】に示すように、アデニン、シトシン塩基などのプロトン化が、それぞれ、pKa3.6、pKa4.2で起こるからである。

【化1】

できる。反応温度は、特に限定されず、縮合反応を室温下で行うことができる。

【0027】また、固相法では、まず固相担体の調製が必要である。固相担体は、特に限定されず、固相ポリマー、結晶ビーズ担体等の従来のものを使用することができる。固相担体に3'末端でヌクレオチドを結合させ、順にヌクレオチドを結合させていく。ヌクレオチド同士の結合は、上述のプロトン供与体の存在下、適当な溶媒中で行う。溶媒としては、THF、CH₃CN、ジメトキシエタン、ジオキサン、DMF、DMA、N-メチルピロリドン等を挙げることができる。反応温度は、特に限定されず、縮合反応を室温下で行うことができる。

【0028】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は、下記実施例に限定して解釈される意図ではない。

【0029】実施例1

本実施例では、液相での核酸の合成を試みた。

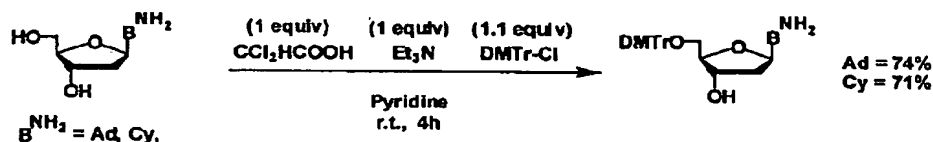
【0030】塩基部位無保護ホスホロアミダイトユニットの合成

塩基部位無保護ホスホロアミダイト法によりDNAを合成する場合、核酸塩基部位が保護されていないdA、dC、デオキシグアノシン(dG)、そしてチミン(T)のアミダイトユニットが必要となる。そのために、まず5'-水酸基のみジメトキシトリチル(DMT)基で保護されたヌクレオシドの合成に取り組んだ。

【0031】dAとdCの水酸基選択的なトリチル化は、常法に従い、ピリジン中、当量のジクロロ酢酸、トリエチルアミンの存在下、小過剰のトリチルクロライドを反応させている。わずかに一工程でdA、dCのトリチル体は、それぞれ74%、71%の収率で得られた(化2)。化2は、dAとdCの水酸基選択的なトリチル化の反応を示す。

【化2】

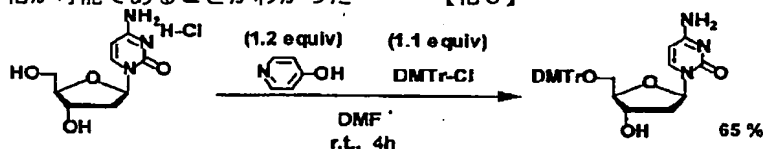
(4)



【0032】また、dCだけは、DMF中、小過剰の4-ヒドロキシピリジンとトリチルクロライドを用いることでも水酸基選択的なトリチル化が可能であることがわかった

(化3)。化3は、ヒドロキシピリジンを用いたdCの水酸基選択的トリチル化の反応を示す。

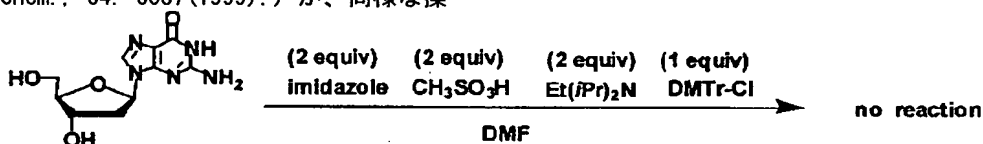
【化3】



【0033】dGの水酸基選択的なトリチル化は、dAやdCよりも困難であり、上記のような手法を用いることはできなかった。過去に早川らは、dGの水酸基選択的なトリチル化の報告をおこなっている。(M. Kataoka, Y. Hayakawa, J. Org. Chem., 64, 6087(1999).) が、同様な操

作を行っても反応は進行しなかった(化4)。化4は、早川らによる報告されたdGの水酸基選択的トリチル化の反応を示す。

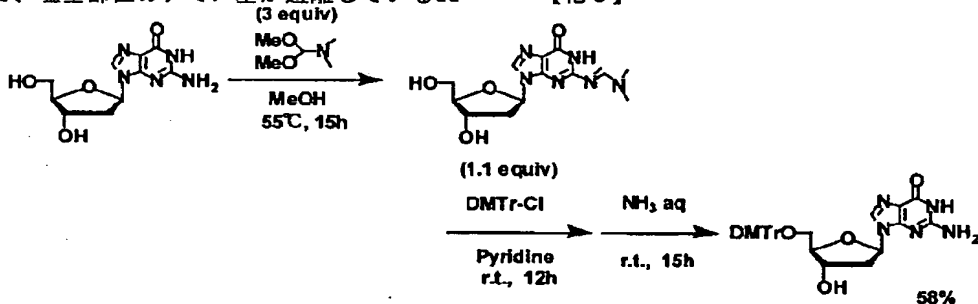
【化4】



【0034】そこで、dGに限っては多少の手間はかかるが塩基部位のアミノ基をアミジン型の保護基で一時的に保護することで、塩基部位のアミノ基が遊離しているdG

のトリチル体を58%で単離した(化5)。化5は、dGの水酸基選択的トリチル化の反応を示す。

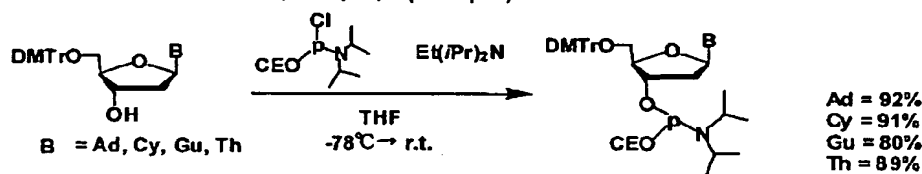
【化5】



【0035】このようにして合成したdA、dC、dGのトリチル体と別途合成したTのトリチル体は、それぞれ(2-シアノエチル) (N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィンを用いてアミダイト化をおこなった。この時、反応

系を -78°C まで冷却することで、塩基部位のアミノ基に対する試薬の副反応が抑制される(化6)。化6は、DMTrヌクレオシドのアミダイト化の反応を示す。

【化6】



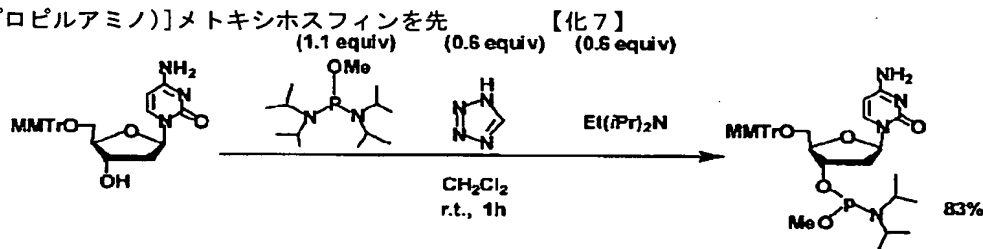
【0036】また、本研究では5'-水酸基に保護基にDMTr基よりも酸性条件に多少安定なモノメトキシトリチル (MMTr) 基を用いたアミダイトユニットを用いたオリゴヌクレオチドの合成検討も行っている。ヌクレオシドのMMTr化は、DMTr化と同様な条件を用いてdA、dG、dC、

Tそれぞれ収率75%、81%、83%、93%で合成した。続く、アミダイト化も先程と同様な条件のもとdA、dG、dC、Tそれぞれ収率83%、71%、85%、94%で合成した。

【0037】後述する実施例4のオリゴヌクレオチドの合成検討では、アミダイトユニット自体の反応性を変え

るためにリンの保護基をシアノエチル基からメチル基に変えて縮合反応を行っている。このリンの保護基がメチル基になっているアミダイトユニットは、クロロ[ビス(N,N-ジイソプロピルアミノ)]メトキシホスフィンを先

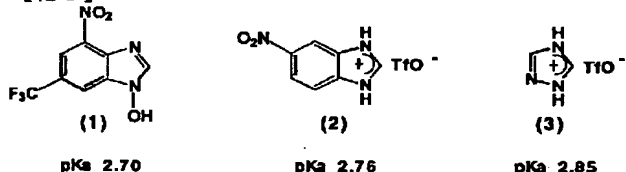
程合成したdCのMMTr体に反応させることで83%の収率で合成した(化7)。化7は、リンの保護基がメチル基のアミダイトユニットの合成を示す。



【0038】活性化剤の合成

本実施例では、活性化剤のpKa、溶解性、吸湿性、そしてアミダイトユニットの活性化能の条件を満たす化合物の内、以下の(1)～(3)の化合物を用いた。以下、これらの活性化剤の合成法について記述する。

【化8】



【0039】4-ニトロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゾトリアゾール-1-オールを、以下の【化9】に示すように1-クロロ-2,6-ジニトロ-4-トリフルオロメチルベンゼンを出発原料として、3ステップで55%の収率で合成した。合成についての詳細は以下の通りである。

【0040】4-ニトロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゾトリアゾール-1-オール

アルゴン雰囲気下、室温で4-クロロ-3,5-ジニトロベンゾトリアゾール(20g 74mmol)のメタノール溶液(80ml)に、ナトリウムメトキシド(7.5g 130mmol)のメタノール溶液(30ml)を徐々に滴下し、撹拌を行った。30分後、2Mの塩酸水溶液(100ml)を加え、反応溶液をろ過した。ろ液を回収し、溶媒を減圧留去し目的の固体(2,6-ジニトロ4-トリフルオロメチルアニソール)を得た。

¹H NMR : 4.10 (s, 3H), 8.15 (s, 1H), 8.23 (s, 1H),

【0041】この固体を十分に乾燥させた後、無水エタノール(100ml)に溶解した。次に、この溶液にヒドラジ

ン-水和物(3.6ml 74mmol)の無水エタノール(25ml)溶液を、アルゴン雰囲気下、0℃で徐々に滴下した。その後、0℃で1時間撹拌をおこなって、溶媒を減圧留去し目的の固体(2,6-ジニトロ4-トリフルオロメチルフェニルヒドラジン)を得た。

【0042】¹H NMR : 4.85 (s, 2H), 8.41 (s, 2H), 9.67 (s, 1H)

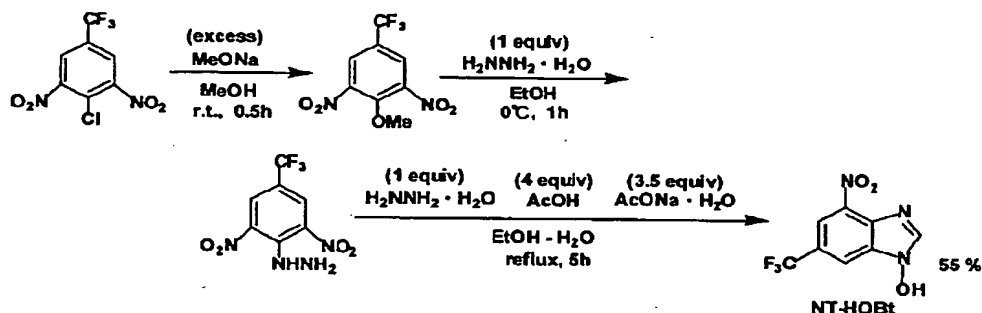
さらに、この2,6-ジニトロ4-トリフルオロメチルフェニルヒドラジン、ヒドラジン-水和物(3.6ml 74mmol)、酢酸(16.9ml 296mmol)そして酢酸ナトリウム三水和物(35g 259mmol)をエタノール-水の混合溶媒(100ml 2:1 v/v)に溶解させ、アルゴン雰囲気下5時間、加熱還流させた。この反応溶液を冷却した後、クロロホルム200mlで希釈し0.1M塩酸水溶液100mlで3回抽出操作を行った。有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させ目的物(4-ニトロ-6-(トリフルオロメチル)ベンゾトリアゾール-1-オール)を得た。(10g 55%)

【0043】¹H NMR : 4.72 - 4.98 (m, 1H), 9.80 (s, 1H), 10.15 (s, 1H),
¹³C NMR : 116.5, 118.6, 122.8, 126.5, 135.8, 138.0
Anal. Calcd for C₇H₃F₃N₄O₃ : C 33.88, H 1.22, N 22.58, F 22.97 Found : C 33.88, H 1.36, N 22.69, F 22.35

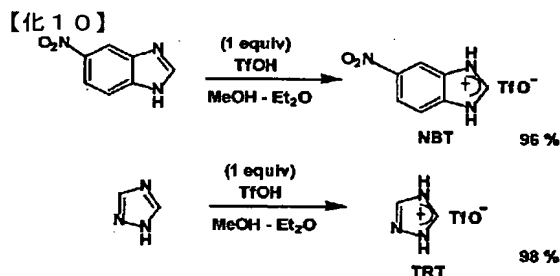
【0044】このヒドロキシトリアゾール誘導体(以下、NT-HOBtと記述する)のpKaは2.70でアセトニトリルやTHFなどの有機溶媒に溶解性が高いほか、吸湿性もなく、従来の活性化剤よりもアミダイトユニットの活性化能は高かった。【化9】は、NT-HOBtの合成を示す。

【化9】

(6)



【0045】4-ニトロベンゾイミダゾリニウムトリフラート (NBT) とトリアゾリニウムトリフラート (TRT) の合成は、早川らのベンゾイミダゾリニウムトリフラート (BIT) (Y. Hayakawa, M. Kataoka, and R. Noyori, J. Org. Chem., 61, 7996 (1996)) の調製報告例に従って行い、高収率で目的物を合成することができた。化10は、NBTとTRTの合成の反応を示す。



【0046】合成法についての詳細は以下の通りである。

4-ニトロベンゾイミダゾリニウムトリフラート
 ニトロベンゾイミダゾール (7.1g 44mmol) をメタノール-エーテルの混合溶媒 (50ml 1:1 v/v) に溶解させたのち、0°C冷却しながらトリフラート (3.9ml 44mmol) を徐々に滴下し、攪拌を行った。その後、反応溶液をエーテル (200ml) にあけることで結晶化させ、その固体をろ過し回収した。(13.2g 96%)

【0047】融点 138~140°C (酢酸エチル)

$^1\text{H NMR}$: 7.97 (d, 1H, $J = 8.9\text{ Hz}$), 8.30–8.34 (m, 1H), 8.63 (d, 1H, $J = 2.16\text{ Hz}$), 9.51 (s, 1H)
 $^{13}\text{C NMR}$: 111.7, 115.5, 120.5, 131.8, 135.8, 144.7, 145.4

Anal. Calcd for $\text{C}_8\text{H}_6\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C 30.68, H 1.93, N 13.42, F 18.20, S 10.24

Found : C 30.60, H 1.91, N 13.44, F 18.28, S 9.21

【0048】1,2,4-トリアゾリニウムトリフラート

トリアゾール (3.0g 44mmol) をメタノール-エーテルの混合溶媒 (50ml 1:1 v/v) に溶解させたのち、0°C冷却しながらトリフラート (3.9ml 44mmol) を徐々に滴下し、攪拌を行った。その後、反応溶液をエーテル (200ml) にあけることで結晶化させ、その固体をろ過し回収した。(9.4g 98%)

【0049】融点 : 162~164°C (酢酸エチル-アセトニトリル)
 $^1\text{H NMR}$: 9.31 (s, 1H), 9.33 (s, 1H)
 $^{13}\text{C NMR}$: 142.85

Anal. Calcd for $\text{C}_3\text{H}_4\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C 16.4, H 1.84, N 19.17, F 26.01, S 14.63

Found : C 16.33, H 1.75, N 19.35, F 25.82, S 14.3

【0050】NBTの pK_a は2.76で、NT-HOBTと同様に、溶解性、吸湿性、活性化能ともに理想的なものであった。TRTに関しては、やや難溶性であるものの pK_a が2.85で、吸湿性はなく、また活性化能も高かった。

【0051】液相での二量体の合成

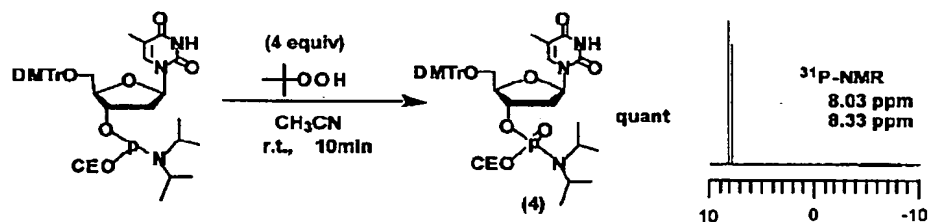
本実施例では、上述したように合成したアミダイトユニットと活性化剤を用いて塩基部位無保護ホスホアミダイト法による液相でのTpC二量体の合成をおこない、従来の活性化剤との比較を行った。

【0052】シチジンのアミノ基は、その求核性の高さからもっとも副反応が起こりやすいことが過去の知見からわかっている。そこで、新規の活性化剤の縮合能を確認するために、今回は液相でTpC二量体の合成をおこなった。

【0053】まず、 $^{31}\text{P-NMR}$ で反応を追いやすくするため、縮合反応中の副生成物を事前に合成し、 $^{31}\text{P-NMR}$ の数値を求めることからはじめた。【化11】に示すように、アミダイトユニットに過酸化物を反応させることで化合物(4)を定量的に得ることができた。その $^{31}\text{P-NMR}$ の値は、8.03、8.33ppmであった。化11は、化合物(4)の合成と化合物(4)の $^{31}\text{P-NMR}$ を示す。

【化11】

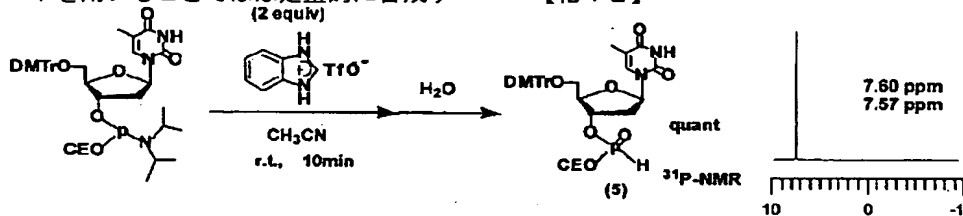
(7)



【0054】H-ホスホネート体 (5) は、ベンズイミダゾールトリフラートをを用いることでほぼ定量的に合成す

ることができた (7.60、7.57ppm)。

【化12】

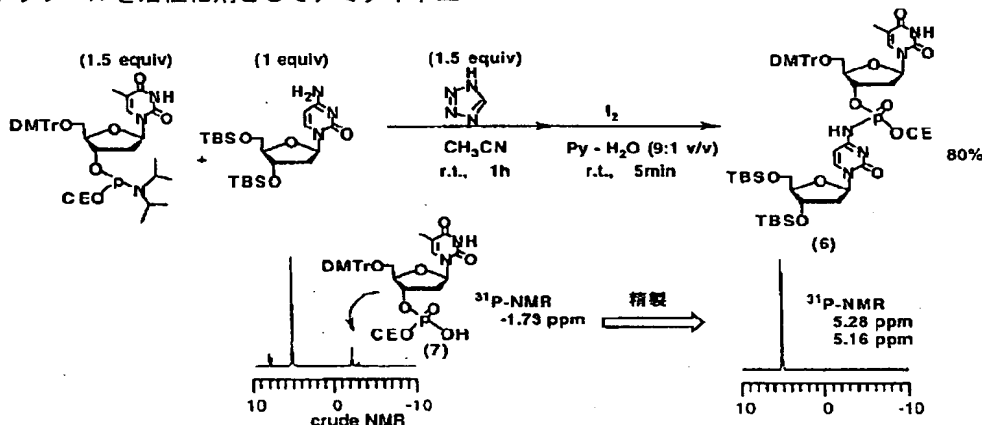


化12は、化合物(5)の合成と化合物(5)の $^{31}\text{P-NMR}$ を示す。

ニットを反応させ、80%の収率でアミデート体 (6) を合成することができた (5.28、5.16ppm)。

【化13】

【0055】また、アミノ基が保護されていないシチジン誘導体にテトラゾールを活性化剤としてアミダイトユ

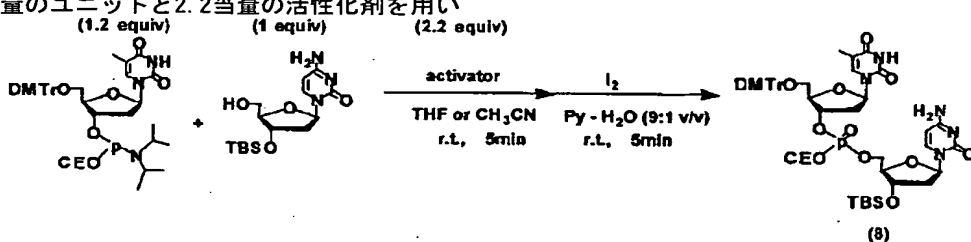


化13は、化合物(6)の合成と化合物(6)の $^{31}\text{P-NMR}$ を示す。

【0056】これらの $^{31}\text{P-NMR}$ の値を参考にし、以降の二量体合成での活性化剤の評価を行った。TpC二量体の合成は、別途合成した3'-水酸基をTBS基で保護したシチジンに1.2当量のユニットと2.2当量の活性化剤を用い

て室温、5分で縮合させた後、ヨウ素酸化をおこなった。活性化剤は、新規の3種の化合物以外にも、比較のために現在までに報告例のあるS-エチルテトラゾールとベンズイミダゾールトリフラートを用いた。

【化14】



【0057】化14は、液相でのTpC二量体の合成を示す。S-エチルテトラゾールはその活性化能があまり高くないため、5分の縮合反応では活性化されないまま酸化された化合物(4)をみるることができた。そのため、この時のTpC二量体の単離収率は68%とあまり高いものでは

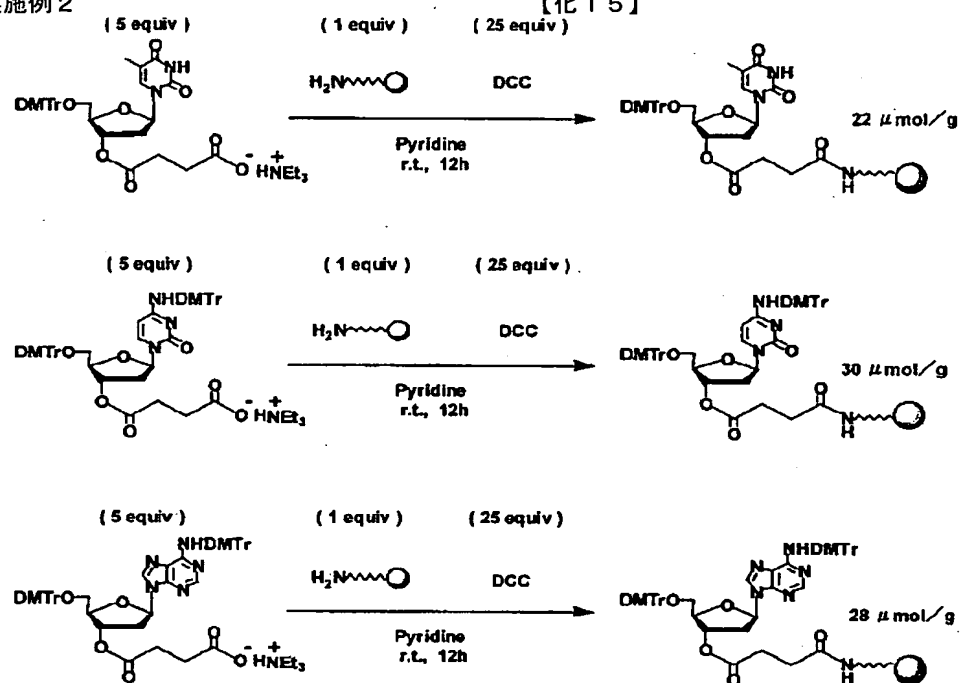
なかった。また、この反応系には、アミデート体 (6) に近い値のケミカルシフトをもつピークが得られていないため、塩基部位への副反応がおこっていないことがわかる。このことは、ホスフィチル化反応において塩基部位のアミノ基と一級水酸基を比較した場合、圧倒的に一

級水酸基の方が高い反応性をもつことを示唆している。この反応性の差を利用して、DNAを合成していく方法が塩基部位無保護法とも言える。図1は、S-エチルテトラゾールを用いたTpC二量体の合成した結果を示す。

【0058】また、図2に示すように、新しく用いた活性化剤であるNBI、NT-HOBtそしてTRTは、ともに塩基部位への副反応を起こすことなく、それぞれ94、83、95%高収率でTpC二量体を合成することができた。

【0059】以上のことから、今回新規に合成した活性化剤を液相中、塩基部位のアミノ基に保護基を用いない条件の縮合反応に用いても、副反応を起こすことなく充分高い収率でDNA二量体の合成を行うことができるという。

【0060】実施例2



【0062】二量体の合成

まず、先程合成したチミジンが導入された固相担体を用いてApT、CpT二量体の合成を行った。合成のサイクルは操作

次に、固相での核酸の合成を試みた。本実施例では、液相中での反応では副反応が観測されなかった新規の活性化剤を過剰のユニットを使用する固相上での反応に用いて、核酸塩基部位への副反応をHPLCで観測した。

【0061】固相担体の調製

固相合成のための固相担体として本研究で使用した担体は、高架橋度ポリスチレン²⁶⁾である。この固相担体表面には、およそ35 $\mu\text{mol/g}$ の一級のアミノ基が存在していて、今回はこの反応点に縮合剤・DCCを用いてサクシニルリンカー介したヌクレオシドを導入した。またこの際、シチジンとアデノシンの塩基部位のアミノ基はDMTr基で保護されている。化15は、固相担体の調製を示す。

【化15】

表1に示す通りであり、その評価は逆相HPLCを用いて行った。

【表1】

			時間
1	洗浄	CH ₂ Cl ₂	
2	脱DMTr化	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	30 sec
3	縮合	アミダイトユニット(20 equiv) 活性化剤 (40 equiv)	1 min
4	洗浄	CH ₃ CN	
5	酸化	I ₂ /Py - H ₂ O (9:1, v/v)	2 min
6	洗浄	CH ₃ CN	
切り出し			conc NH ₃ aq
			40 min

【0063】ApTの合成においては、今回新規に活性化剤として用いたNT-HOBt、TRT、NBTの三種の化合物の他にも、比較のためにテトラゾールとBITを用いた場合についても逆相HPLCによる解析を行っている。まず、解析の参考にApTの逆相HPLCチャートとフォトダイオードアレイ検出器で同時に測定したUV波形を示す。図4に固相

(条件A)

カラム温度：50℃

移動相：solution A: 0.1 M 酢酸アンモニウム (pH 7.0)

solution B: アセトニトリル (B: 0-10% linear gradient)

流量：1.0 ml / min。

分析時間：30 min

(条件B)

カラム温度：50℃

移動相：solution A: 0.1 M 酢酸アンモニウム (pH 7.0)

solution B: アセトニトリル (B: 0-30% linear gradient)

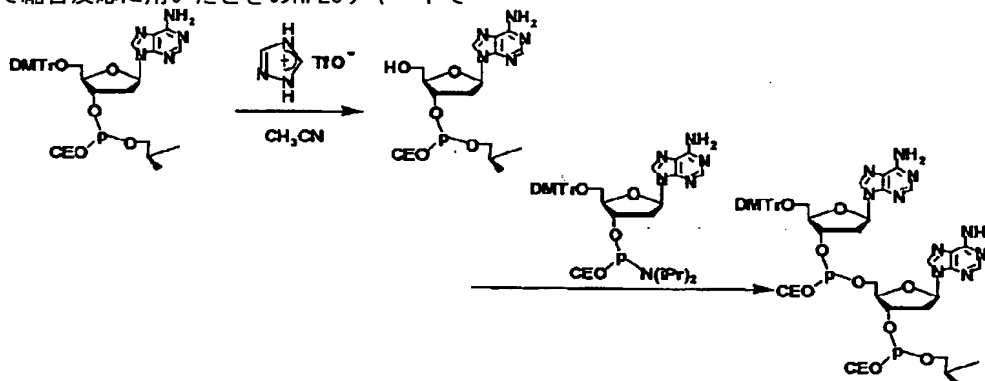
流量：1.0 ml / min。

分析時間：30 min

【0065】テトラゾールは、塩基部位が保護されたアミダイトユニットを用いた固相合成に広く使用されている。このテトラゾールを用いて縮合反応を行った時のHPLCチャートがエントリー1である。目的の二量体のほかにも、塩基部位への副反応生成物のピークを多数観測することができる。このことから、テトラゾールを活性化剤に用いるためには、塩基部位は必ず保護しなければならないことがわかる。

【0066】また、液相反応では塩基部位への副反応が観測されなかったBITでは、テトラゾールを用いたときよりは幾分か減るが、同じ副反応生成物のピークが得られる(エントリー2)。

【0067】エントリー3では、今回合成したNT-HOBtを活性化剤として縮合反応に用いたときのHPLCチャートで



【0069】これと共通したピークは、エントリー5でも確認できる。このピークは、その保持時間とUV波長から、塩基部位への副反応ではなくDMTr基の脱離によりさらに鎖長が伸びたApApT三量体と考えられる。

【0070】エントリー6では、THF溶媒中、NBTを活性

上で合成検討した逆相HPLCチャートを示す。また、以下に、逆相HPLCの条件を示す。

【0064】逆相HPLC

Waters Alliance systemにWaters 3D UV detectorを接続して用いた。操作条件を以下に示す。

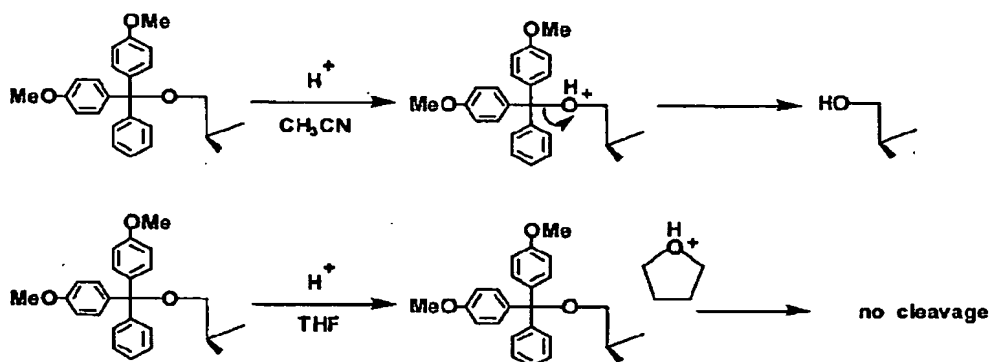
ある。エントリー1や2で用いている従来の活性化剤よりは、はるかに塩基部位への副反応が抑制されている。しかし、保持時間27分の領域にテトラゾールやBITと同じ副反応生成物のピークがわずかであるが観測された。

【0068】前述したようにTRTは、テトラゾールと同様にTHF溶媒に対し溶解性が悪く、アセトニトリル溶媒中でのみ反応を行った。そのとき得られた逆相HPLCチャートがエントリー4である。エントリー4では、エントリー1-3でみられる副反応生成物は、かなり減少しているがこれらのピークとは別に、目的物ApTの直後にピークが観測できた。化16は、活性化剤によるDMTr基の脱離とそれに続く縮合反応を示す。

【化16】

化剤として縮合反応を行ったときの結果である。前述した副反応物のピークは一切観測されず、99%以上の縮合率で目的のApT二量体を合成することができた。化17は、溶媒によるDMTr基の挙動の相違を示す。

【化17】



【0071】 エントリー5で観測されたDMTr基の脱離がエントリー6で見られなかった理由については、[化17]に記しているようにTHFのバッファー効果によりエントリー6の条件においてDMTr基が比較的脱離しにくくなっていると考えられる。

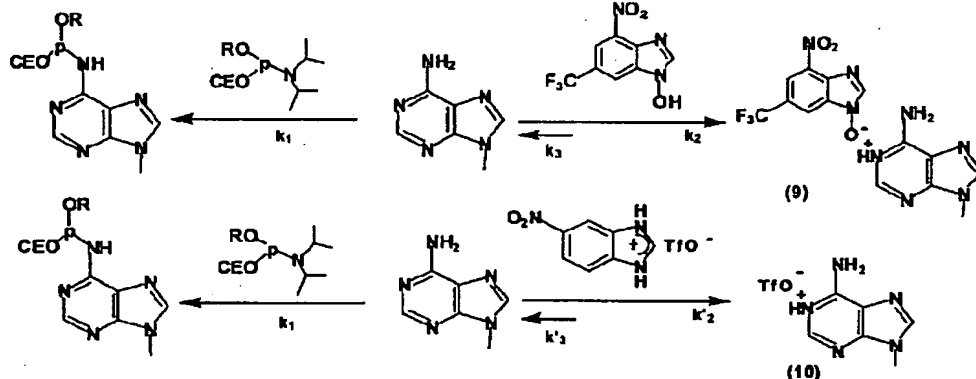
【0072】 また、エントリー3とエントリー6の比較で、 pK_a がほぼ同等な活性化剤であるにもかかわらず、NT-HOBtの方のみが副反応を起こす理由について二つの可能性が考えられる。

【0073】 一つめは、アデニン塩基がプロトン化された際の対アニオンの違いに着目した説明である。[化1

8]に示すようにエントリー6の条件では、アデニン塩基が強酸であるトリフラートとの塩を形成している。一方、エントリー3では、弱酸である活性化剤自身との塩形成である。

【0074】 ここで、 $k_1, k_3 \ll k_2$ ならびに $k_1, k'_3 < k'_2$ である。しかし k_3 が k'_3 より大きく、(9)より(10)の方の寿命が長いから、エントリー6では副反応が観測されないけれども、エントリー3では、多少の副反応があったと考えられる。化18は、アデニン塩基がプロトン化された際の対アニオンの違いを示す。

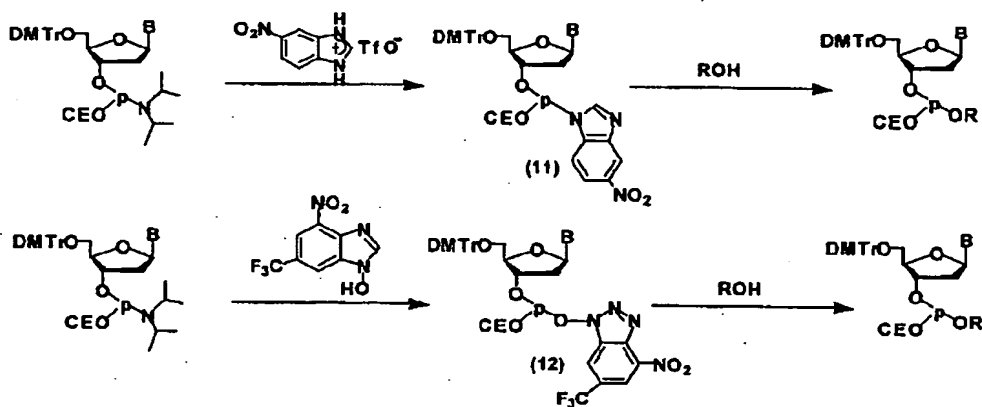
【化18】



【0075】 二つめは、縮合反応の活性中間体に着目したものである。エントリー6の条件では、[化19]のように活性中間体がP-N結合を持っているアミダイト型(9)を経由する。このアミダイト型の中間体は、他のアゾールを活性化剤として用いた場合も生成する。しかし、NT-HOBtの場合はこのようなアミダイト型ではなく、ホス

ファイト型の中間体(10)を経由し反応が進行する。この中間体の反応性が全く違うため、エントリー3では観測される副反応がエントリー6では全く観測されないという説明も考えられる。化19は、活性化剤による中間体の相違を示す。

【化19】



【0076】次に、上述の新規活性化剤を用いて、ApT二量体と同様の合成サイクルでCpT二量体の合成を行った。その逆相HPLCチャートを図5に示す。新規の活性化剤いずれの場合においても、ApT合成においてみられた塩基部位への副反応・DMTr基の脱離は、観測することなく高い縮合率でCpT二量体を合成できた。ちなみに、エントリー7の保持時間22分のピークとエントリー8の保持時間4分のピークは、核酸由来のものではなく溶媒由来のピークである。

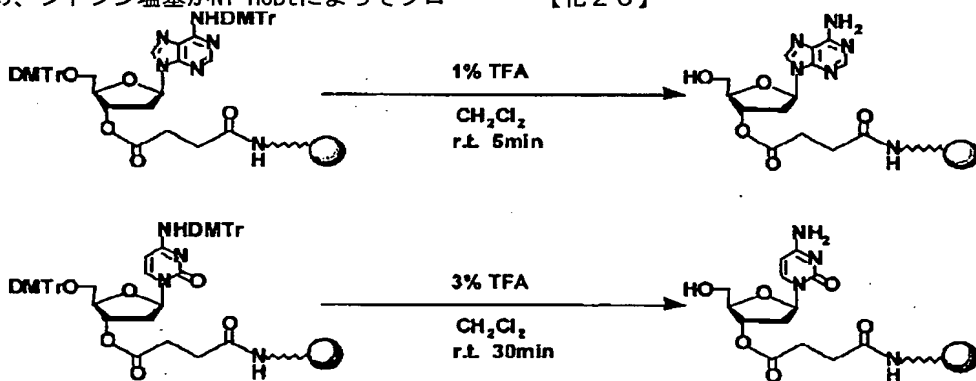
【0077】また、NBTをアセトニトリル溶媒中で用いても、エントリー5の様なDMTr基の脱離は観測されなかった。これらCpTの合成においてDMTr基の脱離が見られなかったのは、シトシン塩基の塩基性がアデニン塩基よりも高いためDMTr基が脱離しにくくなっていると考えられる。

【0078】また、エントリー7で副反応がみられないのは、前述の通りシトシン塩基の塩基性がアデニン塩基よりも高いため、シトシン塩基がNT-HOBtによってプロ

トン化された状態がアデニン塩基の場合よりも安定であるためであろう。

【0079】これまでのCpT、ApT合成の結果からNT-HOBtとTRTを用いた縮合反応は、多少の問題点が指摘できたが、NBIをTHF溶媒中で用いた縮合系では、副反応なく高い縮合率で目的物を合成することができた。以下、この活性化剤に焦点を絞ってApA、CpC、GpTの合成検討を行った。ApAとCpCの合成では、3-2で調製した末端にdAもしくはdCを導入した固相担体として使用した。末端に導入したdA・dCの塩基部位のアミノ基はDMTr基で保護されているが、このDMTr基の脱保護には水酸基のDMTr基の脱保護の場合よりも長時間の酸処理を必要とする。今回は、和田らの報告例に従いdAは1%TFA-ジクロロメタン溶液で5分間、dCは3%TFA-ジクロロメタン溶液で30分間それぞれ処理をし、脱保護を行った。化20は、塩基部位のアミノ基に導入したDMTr基の固相上での脱保護の反応を示す。

【化20】



【0080】固相合成サイクルは基本的には先程のApT合成時と同様であるが、今回は活性化剤としてニトロベンズイミダゾリウムトリフラートのみを用いている。また、dGアミダイトを用いた縮合では、グアニン塩基にほとんど塩基性がないためにトリチル基が脱離しやすく、また過去の知見からグアニン塩基は副反応をおこさないことがわかっていて塩基部位をプロトン化する必要がないため、活性化剤はアミダイトユニットと当量の20当量しか用いていない。以下に切り出し直後・未精製の

ApA、CpC、GpTの逆相HPLCチャートを図6に示す。

【0081】どの場合においても、高い縮合率でまた副反応をおこすことなく、目的物を合成することができた。

【0082】実施例3

NBTを活性化剤として用いるDNA四量体の合成検討

本実施例において、NBTを活性化剤として用いるDNA四量体の合成検討を行った。縮合反応ステップでは二量体合成時と同様に、dA、dCの場合はユニット20当量とNBT40

当量を用い、またdGにおいてはユニット20当量とNBT 20当量を用いて一分間反応させた。合成サイクルも前述した二量体の合成と同じで、酸化にはヨウ素処理を行い固相からの切り出しはアンモニア処理を行った。図7に切り出し直後・未精製のAAAT、CCCT、GGGTの逆相HPLCを示す。図8にNBTを用いたGGGTの固相上での合成結果を示す。

【0083】この結果、四量体の合成でも、高い縮合効率で鎖長の伸長を行うことができ、また塩基部への副反応はほとんど観測されなかった。これらのピークの確認は、massスペクトルによりおこなっている。エントリー6、9-15で見てきたように、活性化剤としてNBTを用いた場合、塩基部位が無保護の条件下でも四量体まで全く問題なく鎖伸長を行うことができた。これは塩基部位無保護ホスホロアミダイト法では初めてのことであり、従来までの手法に必要な、副反応の結果生じるP-N結合を開裂除去するステップを省略し、DNAオリゴマーを合成するという目標にすることができたと言っても過言ではない。

【0084】実施例4

NBTを活性化剤として用いるDNAオリゴヌクレオチドの合成検討

本実施例では、より長い鎖長のDNA合成検討のために、(CAA)₃9量体を合成している。合成条件は前述した固相合成サイクル(表1)を用い、また、5' 水酸基の保護基がDMTr基でリン部位の保護基がシアノエチル基であるアミダイトユニットを使用している。その時の切り出し直後、未精製の陰イオン交換HPLCをエントリー16に示す。

操作	試薬	時間
1 洗淨	CH ₂ Cl ₂	
2 脱DMTr化	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	2 min
3 縮合	アミダイトユニット(20 equiv) 活性化剤 (40 equiv)	1 min
4 洗淨	CH ₃ CN	
5 酸化	I ₂ /Py - H ₂ O (9:1, v/v)	2 min
6 洗淨	CH ₃ CN	
切り出し	conc NH ₃ aq	40 min

【0088】この合成サイクルを用いて合成したC₆Tの切り出し直後、未精製の陰イオン交換HPLCをエントリー18に示す。図11のチャートが示すように、副反応物は以前と全く変わらずメインピークより後ろに観測される。このことから、この副反応がトリチル基の脱離によっておこっていたのではないことがわかった。

【0089】以前、Letsingerら(S. M. Gryaznov, R. L. Letsinger, J. Am. Chem. Soc., 113, 5876(1991).、

【0085】目的の9量体のピークはメインに観測されるものの、4量体までのDNA合成では観測されていなかった目的物より鎖長の長い副反応生成物が今回の合成では問題となった。この副反応は、(CAA)₃という配列に限ってあらわれるものではなく、以下に示すC₆Tの合成においても観測される。

【0086】ここでC₆Tの合成を行ったのは、目的化合物の塩基の種類と鎖長を減らすことで、反応の解析をより簡単にするためである。合成条件は前述した固相合成サイクル(表1)を用い、また、5' 水酸基の保護基がDMTr基でリン部位の保護基がシアノエチル基であるアミダイトユニットを使用している。この場合においても(CAA)₃のときと同様、目的の7量体のピークはメインに観測されるものの、目的物より鎖長の長い副反応生成物がみられた。

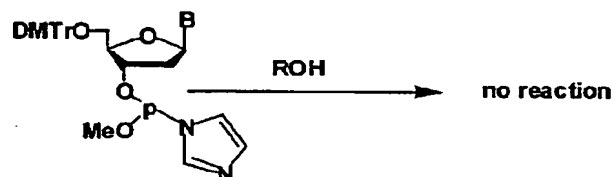
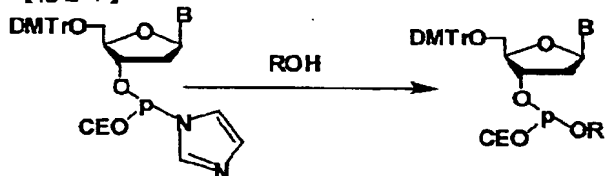
【0087】そこで、この副反応を抑制するために今回は2つの操作を行っている。一つめの操作では、アミダイトユニットの5' 水酸基の保護基をDMTr基からMMTr基にかえて、縮合反応を行った。もう一つは、リン部位の保護基をシアノエチル基からメチル基に変えたアミダイトユニットを使用して縮合反応をおこなっている。アミダイトユニットの5' 水酸基の保護基をDMTr基からMMTr基にかえた操作を行ったのは、縮合反応中にDMTr基の脱離が起きたため目的物よりも鎖長の長い副反応生成物が観測されたのではないかという懸念からである。この時の合成条件は、後述する固相合成サイクル(表2)を用いているが、これは今まで用いてきた合成サイクルと比較して脱トリチル化の反応時間を長めに設定している。

【表2】

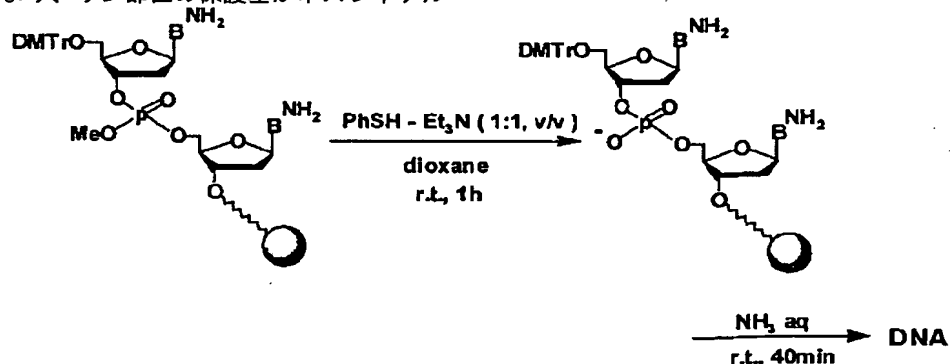
S. M. Gryaznov, R. L. Letsinger, Nucleic Acids Res., 20, 1879(1992).)は、リン部位の保護基がメチル基であるアミダイトユニットを活性化し、イミダゾリド体に変換してもアルコールとは反応しないことを³¹P-NMRで確認している。一方、リン部位の保護基がシアノエチル基であるアミダイトユニットを活性化したイミダゾリド体は、アルコールと反応しホスファイトを形成することもわかっている。[化21]は、リン部位の保護基が

ホスフィチル化反応に与える影響を示す。

【化21】



【0090】つまり、リン部位の保護基がホスフィチル



このときの、合成サイクルを表3に示す。

【表3】

操作	試薬	時間
1 洗浄	CH ₂ Cl ₂	
2 脱DMTr化	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	2 min
3 縮合	アミダイトユニット(20 equiv) 活性化剤 (40 equiv)	1 min
4 洗浄	CH ₃ CN	
5 酸化	I ₂ /Py - H ₂ O (9:1, v/v)	2 min
6 洗浄	CH ₃ CN	
脱保護	PhSH - Et ₃ N - dioxane (1:1:2, v/v/v)	1 h
切り出し	conc NH ₃ aq	40 min

NBTを用いたCpTの固相上での合成（陰イオン交換HPLC）を図12に示す。

【0092】

【発明の効果】本発明の核酸の合成法によれば、より迅速、かつ正確に所望の核酸を合成するという有利な効果を奏する。

【0093】また、本発明の核酸の合成法によれば、合成の工程を短縮化することができるため、より簡便に核酸を合成し得るという有利な効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

化反応に与える影響は大きく、アミダイトユニットの反応性をずいぶんと変えてしまう。そこで、このような知見をもとに塩基部位への副反応を抑制するためのもう一つ操作として、リン部位の保護基をシアノエチル基からメチル基に変えたアミダイトユニットを使用して縮合反応をおこなった。アミダイトユニットの反応性を低くして、塩基部位への反応を抑制することが目的である。

【0091】今まで用いてきた、シアノエチル基はアンモニア処理でβ脱離し脱保護をされるが、ここでは脱メチル化のため、【化22】に示すように固相上でベンゼンチオール処理を行っている。この処理を1時間行った後、通常の切り出し操作をおこなって、反応生成物を得た。化22は、固相上での脱メチル化の反応を示す。

【化22】

【図1】 S-エチルテトラゾールを用いたTpC二量体の合成を示す。

【図2】 BIT、NBT、NT-HOBt、及びTRTを用いたTpC二量体の合成を示す。

【図3】 ApTの逆相HPLC（条件A）とUVを示す。

【図4】 固相上でのApT合成の逆相HPLC（条件A）の結果を示す。

【図5】 CpT二量体の固相合成の逆相HPLC（条件B）の結果を示す。

【図6】 NBTを用いたCpC、ApA、GpTの固相上での合成

(逆相HPLC・条件A)の結果を示す。

【図7】 NBTを用いたCCCT、AAATの固相上での合成（逆相HPLC・条件B）の結果を示す。

【図8】 NBTを用いたGGGTの固相上での合成（逆相HPLC・条件A）の結果を示す。

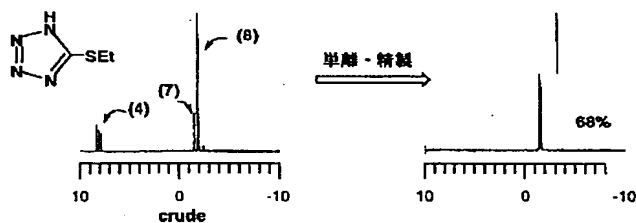
【図9】 NBIを用いた(CAA)₃の固相上での合成（陰イオン交換HPLC）の結果を示す。

【図10】 NBTを用いたC₆Tの固相上での合成（陰イオン交換HPLC）の結果を示す。

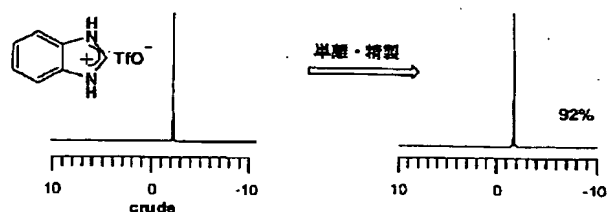
【図11】 NBTを用いたC₆Tの固相上での合成（陰イオン交換HPLC）の結果を示す。

【図12】 NBTを用いたC₆Tの固相上での合成（陰イオン交換HPLC）の結果を示す。

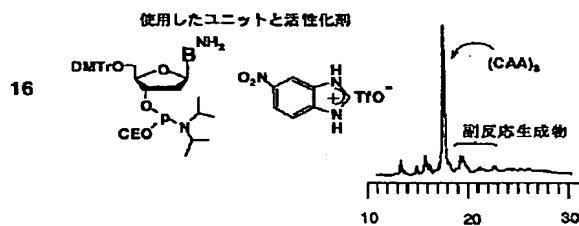
【図1】



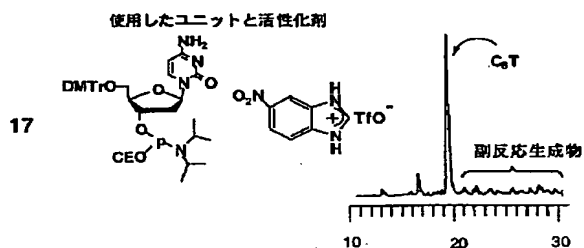
【図2】



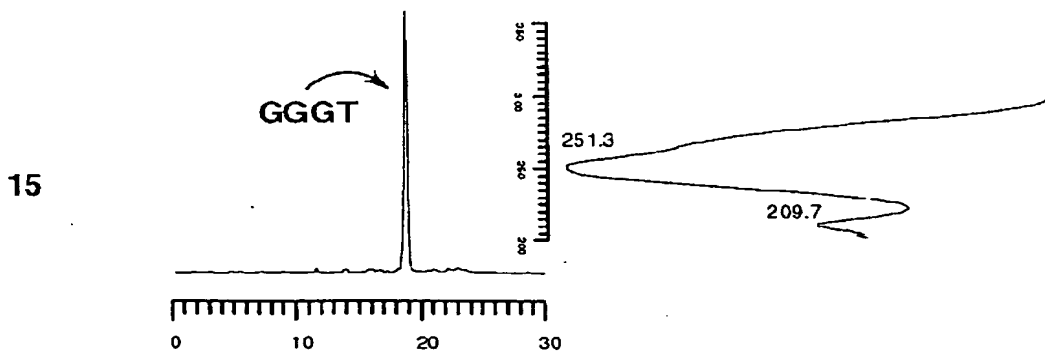
【図9】



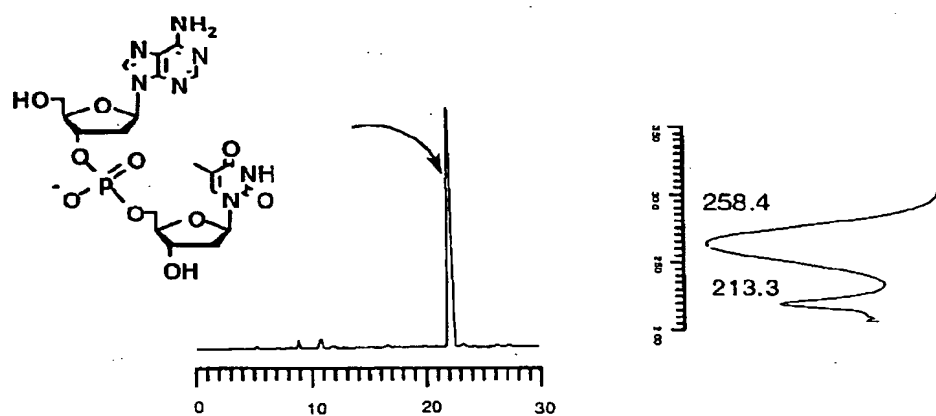
【図10】



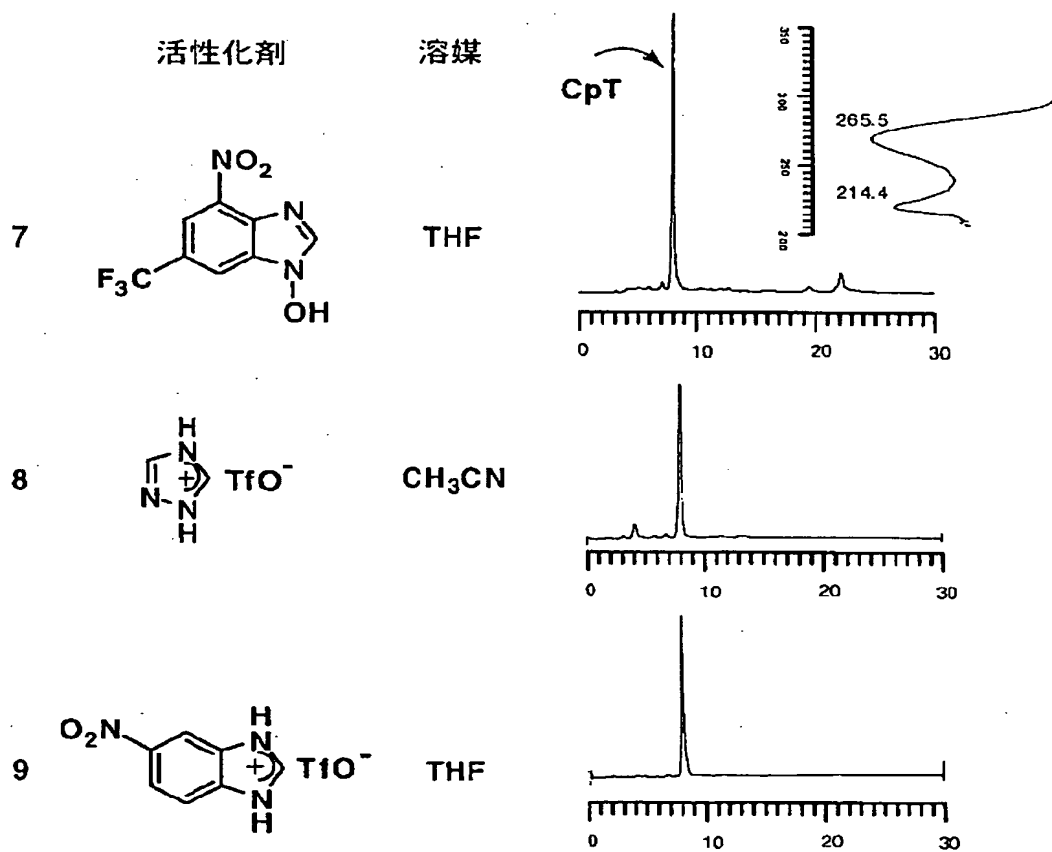
【図8】



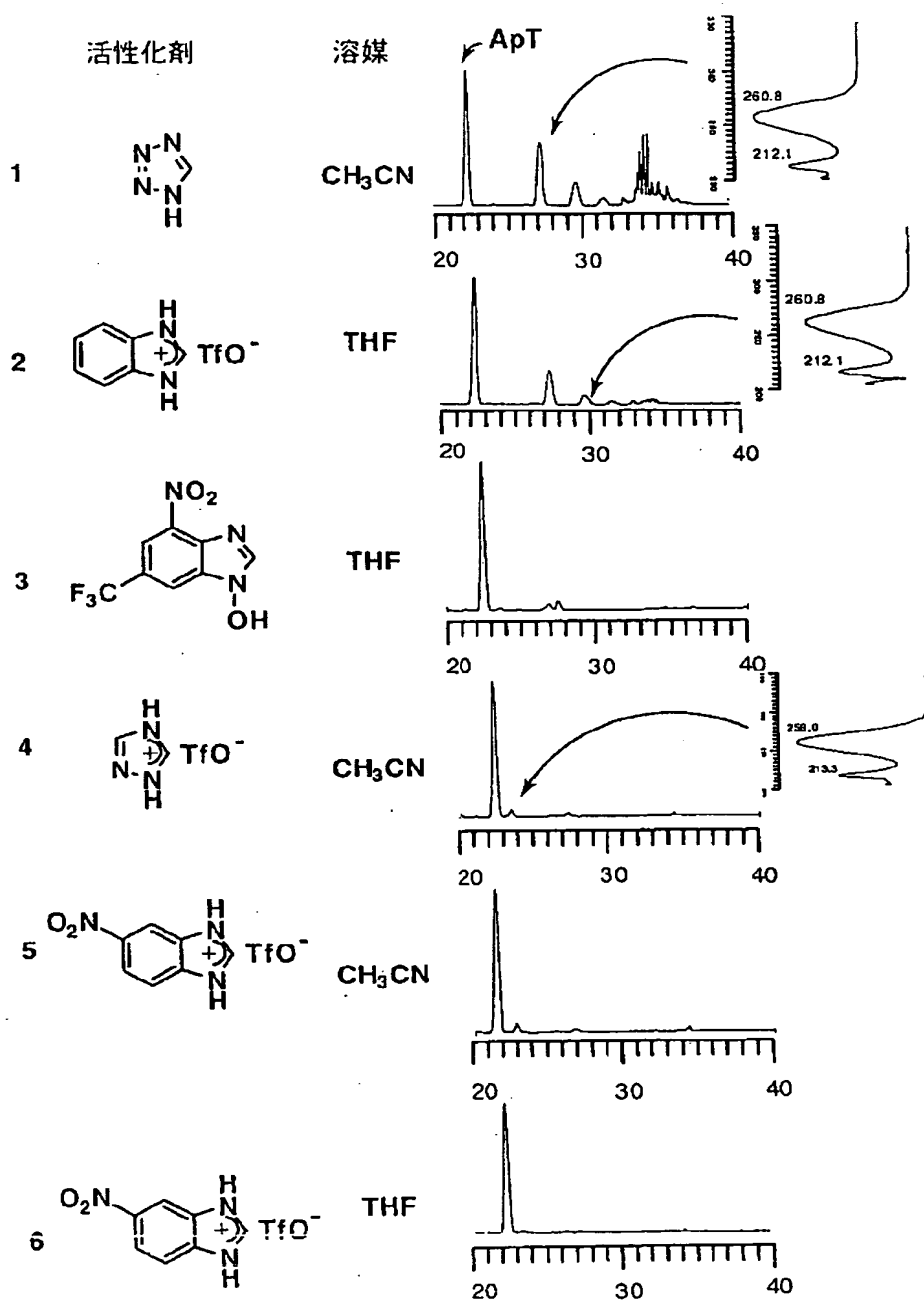
【图3】



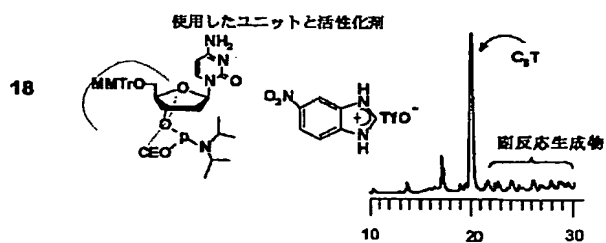
【图5】



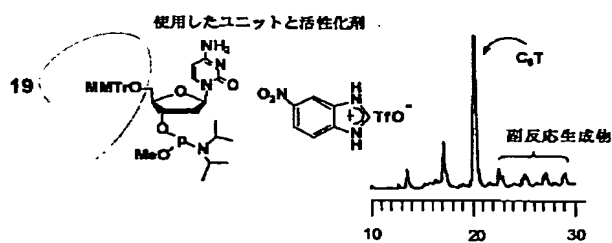
【図 4】



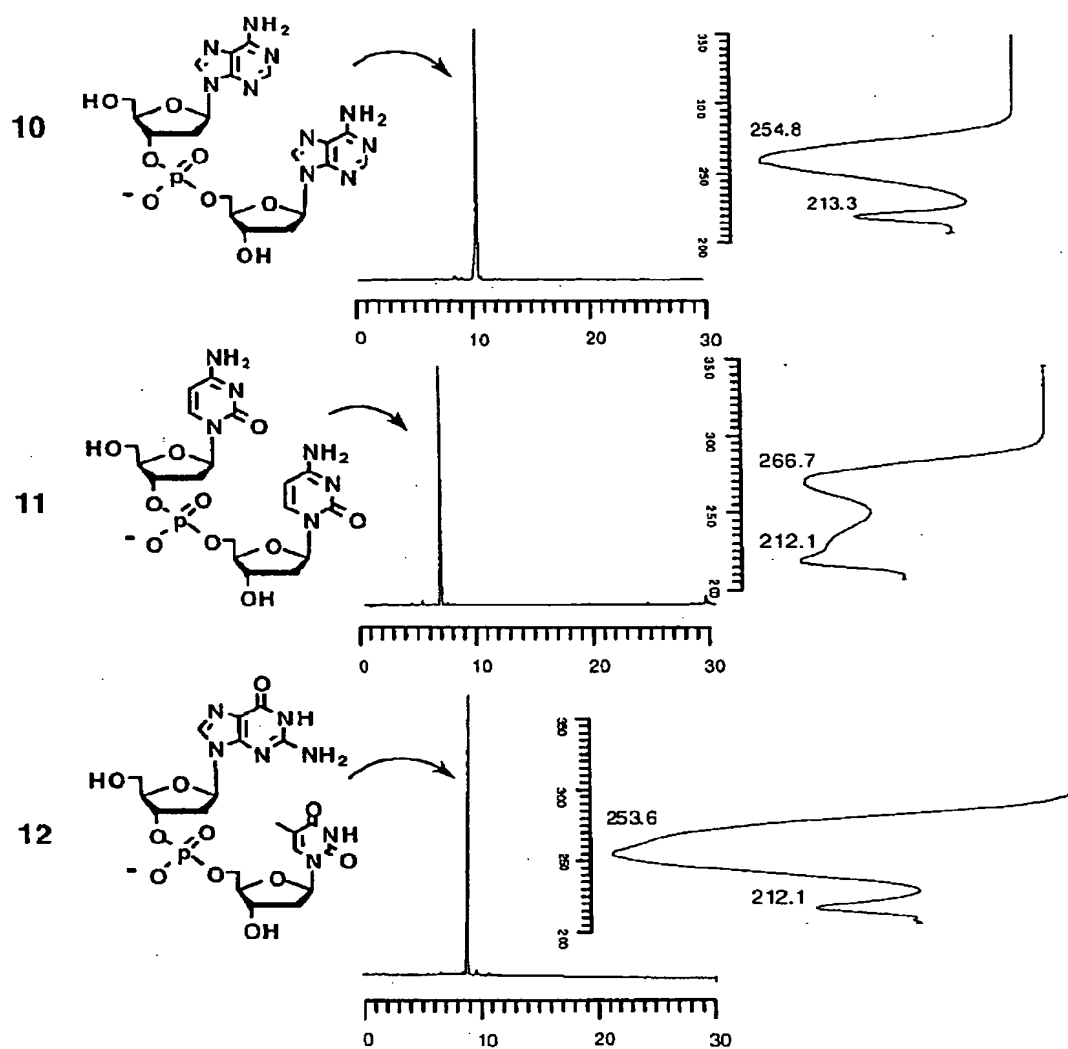
【図 11】



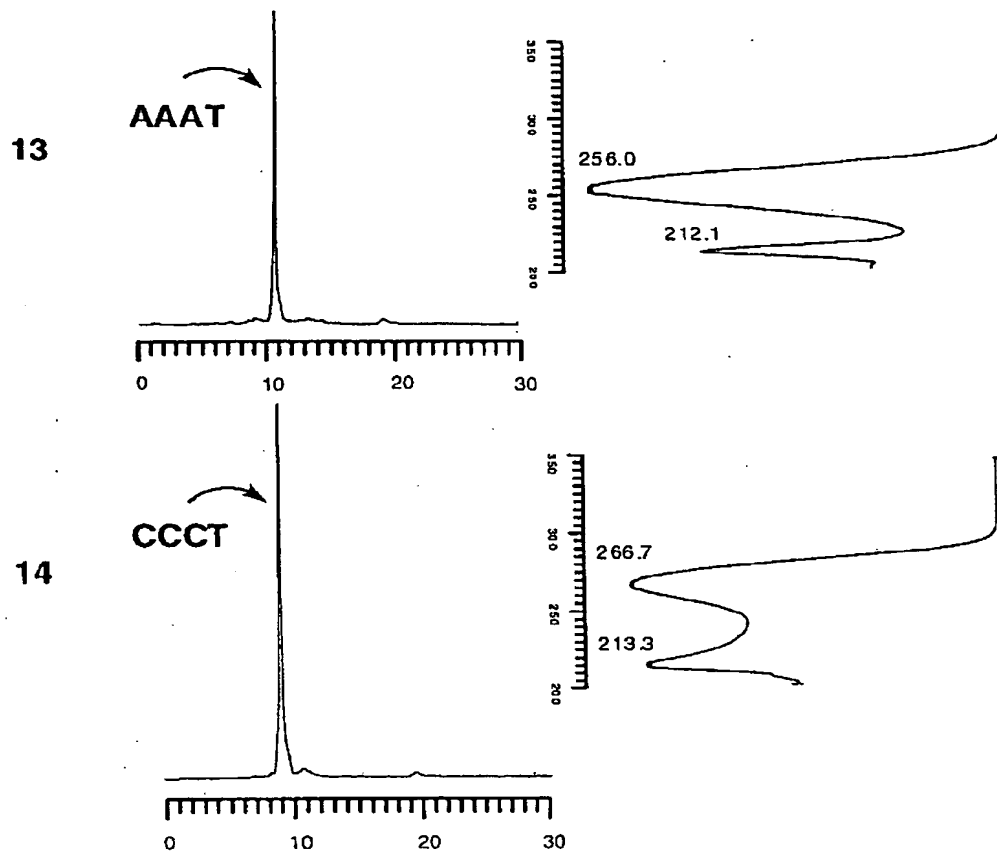
【図 12】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(72) 発明者 大窪 章寛
東京都町田市小川 1-10-5-202

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 HA20
4C057 AA21 BB02 BB05 DD01 MM04